

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Bakteriologie

Vorstand: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Jürgen Heesemann

**Vergleichende Untersuchungen zur Adhärenz und
Mauspathogenität von *Yersinia*-Adhäsine (YadA)-Varianten
verschiedener *Yersinia*-Arten und -Serotypen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sarah Untiet

aus
Offenbach am Main

2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Andreas Sing
Priv.-Doz. Dr. Gabriele Rieder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. N. Ackermann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2013

Meinen Liebsten

1	Einleitung	1
1.1	Einführung in die Gattung <i>Yersinia</i>	1
1.1.1	Entdeckung und Einteilung	1
1.1.2	Isolierungsmethoden, Differenzierung und Verbreitung.....	2
1.2	Klinik, Diagnostik und Therapie der Yersiniose.....	4
1.2.1	Klinik der Yersiniosen	4
1.2.2	Diagnostik	6
1.2.3	Therapie.....	6
1.3	Pathogenese und Pathogenitätsprinzip	7
1.3.1	Invasion und Dissemination	7
1.3.2	Abszessbildung durch <i>Y. enterocolitica</i>	8
1.4	Virulenzfaktoren.....	9
1.4.1	Typ3-Sekretions-System	10
1.4.2	Yops	10
1.4.3	Invasin	11
1.4.4	Weitere Virulenzfaktoren	11
1.5	Adhäsine.....	13
1.5.1	Fimbrien und Pili.....	13
1.5.2	Nicht-Fimbrien-Adhäsine.....	14
1.5.3	Sekretionssysteme und Autotransporter	14
1.5.4	Die Oca-Familie	16
1.5.5	Das <i>Yersinia</i> -Adhäsın A (YadA).....	17
1.5.6	Struktur von YadA	17
1.5.7	Funktionen von YadA	19
1.6	Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material:	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Chemikalien und Biochemikalien	26
2.1.3	Nährmedien	28
2.1.4	Antibiotika.....	28
2.1.5	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	29

2.1.6	Verwendete Primer/Oligonukleotide.....	33
2.1.7	Verwendete Antikörper	35
2.1.8	Enzyme.....	35
2.1.9	Proteine.....	36
2.1.10	Zellkultur	36
2.1.11	Molekularbiologische Kits	37
2.1.12	Software	37
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Kultivierung von Bakterien	37
2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation.....	38
2.2.3	Plasmid-Entfernung.....	40
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNS	41
2.2.5	DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen.....	42
2.2.6	DNS-Agarosegel-Elektrophorese	43
2.2.7	Gelextraktion von DNS	44
2.2.8	Ligation von DNS-Fragmenten	45
2.2.9	Polymerasekettenreaktion	45
2.2.10	Primerdesign.....	47
2.2.11	Mutagenese-PCR.....	48
2.2.12	Mutagenese bakterieller Plasmid-DNS mittels linearer PCR-Fragmente (ET-Rekombination)	48
2.2.13	Konstruktion von Plasmiden und Stämmen	50
2.2.14	DNS-Sequenzierung	54
2.2.15	Stammkonservierung.....	55
2.2.16	Isolierung von bakteriellen Außenmembranproteinen (Outer Membrane Proteins, OMP).....	55
2.2.17	Proteinmengenbestimmung nach Lowry	57
2.2.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
2.2.19	Immunoblot/ Western Blot.....	60
2.2.20	Coomassie-Färbung eines Proteingels	62
2.2.21	IFM (Immunfluoreszenz-Mikroskopie)	63
2.2.22	Agglutinationstests	63
2.2.23	ELISA zum Nachweis der Kollagen- und Fibronectin-Bindung der YadA- positiven Yersinien.....	65

2.2.25	Methoden zur Arbeit mit Zellkulturen	67
2.2.26	Adhärenz-Assay an HeLa-Zellen	68
2.2.27	Gentamicin-protection-Assay / Invasions-Assay für HeLa-Zellen	69
2.2.28	Mausinfektionsversuche	70
2.2.29	Anfertigung von Kryoschnitten	72
2.2.30	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	73
2.2.31	Immunfluoreszenzfärbung (indirekte Methode)	74
2.2.32	Mikroskopie	76
2.2.33	Statistische Auswertung	76
3	Ergebnisse	77
3.1	Nachweis der YadA-Hybride auf der Oberfläche der Außenmembran von <i>Y. enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i>	77
3.1.1	Nachweis von YadA in der Außenmembranpräparation	77
3.1.2	Immunoblot-Überprüfung der <i>yadA</i> -Gendeletion von <i>Y. pseudotuberculosis</i>	77
3.1.3	Agglutinationsversuche und Immunfluoreszenztest	79
3.2	Adhärenz- und Invasionsverhalten der YadA-Varianten- und YadA-Hybrid-Stämme	79
3.2.1	Adhärenzverhalten an Kollagen und Fibronektin	81
3.2.2	Adhärenz- und Invasionsverhalten mit HeLa-Zellen	84
3.3	Die Rolle der YadA-Varianten und -Hybride im Mausinfektionsmodell	84
3.3.1	Vergleich der Mausvirulenz der Stämme mit YadA-Varianten und -Hybriden	85
3.4	Histochemische Analyse	88
3.4.1	Peyersche Plaques	89
3.4.2	Milzen.....	100
4	Diskussion	107
4.1	Einfluss von YadA auf EZM-Bindung, HeLa-Zelladhärenz und -Invasion	107
4.2	Rolle von YadA im in vivo Mausmodell	109
4.2.1	Disseminationswege	109
4.2.2	Interaktion mit lymphatischen Zellen	112
4.3	Einfluss von Spezies-Unterschieden in YadA auf Zellinteraktion und Mausvirulenz	113
4.3.1	Einfluss von YadA auf die Virulenz von <i>Y. pseudotuberculosis</i>	114
4.4	Pathoadaptive Anpassung und neue Adhäsine	115
5	Zusammenfassung	117
6	Literaturverzeichnis	119
7	Anhang	1333

7.1 Abkürzungsverzeichnis	1333
7.2 Danksagung	1355
7.3 Bilder	137
7.3.1 Peyersche Plaques	137
7.3.2 Milzen.....	144

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Gattung *Yersinia*

1.1.1 Entdeckung und Einteilung

1894 isolierte der Schweizer Arzt und Bakteriologe Alexandre Yersin (1863 – 1943) in Hong Kong den Erreger der Pest aus den Beulen von Pestleichen und erkannte die Bedeutung von Ratten und Rattenflöhen bei der Übertragung der Seuche. Die zunächst *Pasteurella* genannte Gattung wurde 1964 ihm zu Ehren in *Yersinia* umbenannt (Bottone, 1997; Yersin, 1894). *Y. pestis* ist ein primär für Nagetiere pathogenes Bakterium, dessen Übertragung auf den Menschen durch den Biss infizierter Flöhe (*Xenopsylla cheopis*) erfolgen kann. Im Menschen kann *Y. pestis* Lungenpest, Beulenpest oder auch eine Pestsepsis hervorrufen. (Perry, *et al.*, 1997). Der Pest fielen über Jahrhunderte in mehreren epidemischen und pandemischen Wellen Millionen von Menschen zum Opfer. Besonders verheerende Epidemien traten im Mittelalter in Europa auf, eine pandemische Ausbreitung der als „Schwarzer Tod“ bekannten Seuche forderte zwischen 1347 und 1352 Schätzungen zufolge 25 Millionen Tote (Ell, 1984). Auch heute tritt die Pest in einigen Ländern noch endemisch auf (Butler, *et al.*, 1980). Vor diesem Hintergrund stellt die Entdeckung des Pesterregers einen wichtigen Schritt im Kampf des Menschen gegen Infektionskrankheiten dar.

Zur Gattung *Yersinia* zählen elf Spezies, von welchen aber nur drei humanpathogen sind. Dies sind neben *Y. pestis* die beiden enteropathogenen Spezies *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*. (Bottone, 1997; Brenner, 1979; Garrity, *et al.*, 2004). Sie stellen nach *Salmonella* und *Campylobacter jejuni* den dritthäufigsten Erreger bakterieller Enteritiden dar (Heesemann, 2001). Unter den nicht humanpathogenen Spezies zeigt *Y. ruckeri* Fischpathogenität und einige Serotypen von *Y. kristensenii* zeigen Virulenz in Mäusen, die mit Eisenverbindungen vorbehandelt wurden (Robins-Browne, *et al.*, 1991). Für die Arten *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. rhodei*, *Y. mollaretii* und *Y. bercovieri* konnte keine Tierpathogenität nachgewiesen werden (Shayegani, *et al.*, 1981). Eine Übersicht aller Spezies findet sich in Tabelle 1.

Da das in dieser Arbeit untersuchte Außenmembranprotein *Yersinia* Adhäsins A (YadA) ausschließlich von den enteropathogenen Spezies *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* exprimiert wird, beschränken sich die weiteren Ausführungen weitestgehend auf diese.

Yersinia-Art	Pathogenität
<i>Y. pestis</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i> <i>Y. enterocolitica</i>	humanpathogen (<i>Y. pestis</i> : Pest ; <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> : Yersiniosen)
<i>Y. ruckeri</i>	fischpathogen (Rotmaulerkrankung bei Lachsen und Forellen)
<i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. rohdei</i> , <i>Y. aldovae</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>Y. bercovieri</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. mollaretii</i>	Apathogen

Tabelle 1: Übersicht über Nomenklatur und Pathogenität der 11 Yersinia-Arten

1.1.2 Isolierungsmethoden, Differenzierung und Verbreitung

Yersinien sind gramnegative, fakultativ anaerobe, pleomorphe, nicht-sporenbildende Stäbchen. Sie sind Katalase positiv und Zytochrom-c-Oxidase negativ, außerdem kann *Y. enterocolitica* Hämin- sowie Hydroxamat-gebundenes Eisen verwerten (Selbitz, 2001). Yersinien sind relativ resistent gegenüber Umwelteinflüssen, so können sie im Boden über Monate bis Jahre infektiös bleiben. Zudem stellen sie keine besonderen Ansprüche an Nährmedien und können in Bouillon-Kulturen oder auf konventionellen Nährböden, besonders Blutagar, angezüchtet werden. *Y. pestis* wächst in einem Temperaturbereich von 22 °C bis 37 °C, mit einem Wachstumsoptimum zwischen 28 °C und 30 °C. Der Wachstumsbereich von *Y. enterocolitica* liegt zwischen 4 °C und 42 °C (mesophil), der von *Y. pseudotuberculosis* zwischen 18 °C und 42 °C, mit einem jeweiligen Temperaturoptimum zwischen 26 °C und 28 °C. Bei einer Anzuchttemperatur zwischen 22 °C und 28 °C sind *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* mono- bis peritrich begeißelt und damit beweglich, im Gegensatz zu *Y. pestis*, die immer unbeweglich ist. Bei 37 °C sind allerdings auch die enteropathogenen Yersinienarten unbeweglich (Bottone, 1977; Bottone, 1999; Dörries, et al., 2004; Selbitz, 2001; Wauters, et al., 1987).

Aufgrund ihrer bei 4 °C erhaltenen Vermehrungsfähigkeit (psychrophil) eignet sich die Kälteanreicherung zur Isolierung von *Y. enterocolitica* von ihrer Begleitflora, zum Beispiel in Stuhlproben. Gleichzeitig ist diese Fähigkeit für die Lebensmittelindustrie von Bedeutung. Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung stellt die Anzucht auf *Yersinia*-selektivem CIN-Agar dar. Dieser enthält eine Dreifach-Kombination der Antibiotika Cefsulodin, Irgasan und Novobiocin zur Abtötung der Begleitkeime (Schiemann, 1979).

Verwandte *Yersinia*-Spezies lassen sich, wie auch andere fakultativ anaerobe gramnegative Stäbchen aus der *Enterobacteriaceae*-Familie, durch die Untersuchung ihrer biochemischen und serologischen Eigenschaften unterscheiden und in Serogruppen aufteilen. *Y. pseudotuberculosis* bildet eine biochemisch einheitliche Gruppe, in der 21 Serotypen unterschieden werden (Wren, 2003). In Deutschland sind ausschließlich die Serovare O:1, O:2 und O:3 verbreitet (Aleksic, *et al.*, 1995; Selbitz, 2001). Als biochemisch und serologisch sehr heterogene Art wird *Y. enterocolitica* in sechs Biovare (1A, 1B, 2, 3, 4 und 5) und etwa 60 Serovare unterteilt (O- und H-Antigene) (Wauters, *et al.*, 1987; Wauters, *et al.*, 1991). Von den sechs Biovaren sind nur die Biovare 1B, 2 und 4 humanpathogen. Unter den bekannten Serovaren finden sich nur elf mit humanmedizinischer Relevanz, wobei dies in Europa und Japan die Biovare 2 und 4 mit den Serotypen O:3, O:9 und O:5,27 sind (sog. „old-world strains“), in den USA die Serotypen O:4, O:8, O:13, O:20 und O:21 (Biovar 1B) (sog. „new-world strains“) (Aleksic, *et al.*, 1990). Mittlerweile kann eine rasche Unterscheidung der Biogruppen auch mittels PCR und Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung mit rRNA spezifischen fluoreszierenden Oligonukleotiden erfolgen (Trebesius, *et al.*, 1998). Zudem können die enteropathogenen Yersinien anhand ihrer Virulenz im Mausmodell in eine apathogene, eine schwach-pathogene und in eine mausletale Gruppe unterteilt werden. Zur mausletalen Gruppe zählen alle *Y. pseudotuberculosis*-Serogruppen und die sogenannten „new-world strains“ von *Y. enterocolitica*. Die nicht-mausletalen Serogruppen von *Y. enterocolitica* entsprechen den sogenannten „old-world strains“ (Carter, 1975; Cornelis, *et al.*, 1987). *Y. pestis* exprimiert kein O-Antigen aufgrund einer Deletion im O-Antigen-Cluster, wodurch eine Unterteilung in verschiedene Serotypen nicht möglich ist (Skurnik, *et al.*, 2000). Man unterteilt die Spezies anhand phänotypischer Eigenschaften wie der Nitrat-Reduktion und Glyceril-Fermentation in die Biovare *Antiqua*, *Orientalis* und *Medievalis* (Achtman, *et al.*, 1999). In den letzten Jahren wurde anhand der Genotypisierung von *Y. pestis* eine Unterteilung in den endemischen und epidemischen *Y. pestis* Typ vorgenommen. Beide Typen entwickelten sich vor ca. 1500-20000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis* (Achtman, *et al.*, 1999; Lindler, 2009).

Während *Y. pestis* fast ausschließlich durch den Biss infizierter Ektoparasiten, wie dem Rattenfloh, übertragen werden, erfolgt die Übertragung der enteropathogenen Yersinien vor allem über infizierte Lebensmittel tierischer Herkunft. Generell kann man *Y. enterocolitica* in der Umwelt in gemäßigten und subtropischen Klimazonen in Oberflächenwasser, Erdböden und auf Pflanzenoberflächen finden. Außerdem können so gut wie alle warmblütigen Heim-, Nutz- und Wildtiere als Wirt dienen. Sogar in Fischen, Reptilien und Insekten konnte der

Humanpathogenität	Biotyp	Serotyp	Verbreitung
-	1A	O:5, O:6,30, O:7,8 O:18, O:46	Darm von Säugetieren, Umwelt
+	1B	O:8 , O:4, O:13, O:18, O:20, O:21	Schwein, USA (O:8), Wildtiere, Umwelt
+	2	O:9 , O:5,27	Schwein, Europa (O:9), USA, Japan (O:5,27)
+	3	O:1,2,3, O:5,27	Chinchilla, Schwein (O:5,27)
+	4	O:3	Schwein, Europa, USA
+	5	O:2,3	Hase, Europa

Tabelle 2: Korrelation von Virulenz, Biotyp, Serotyp und Verbreitung von *Y. enterocolitica* (nach Bottone, 1997(Bottone, 1997))

Erreger nachgewiesen werden (Bockemühl, *et al.*, 2004) (siehe Tabelle 2). Hauptsächlich wird *Y. enterocolitica* durch kontaminierte Lebensmittel, wie Schweinefleisch (ca. 60 % aller Yersiniosen) und Milchprodukte, auf den Menschen übertragen (Shayegani, *et al.*, 1981; Tauxe, *et al.*, 1987). Auch eine Übertragung von Mensch zu Mensch durch Schmierinfektion ist möglich, wenn auch selten (Bockemühl, *et al.*, 2004). Der natürliche Wirt von *Y. pseudotuberculosis* scheinen, wie für *Y. pestis*, Ratten zu sein (Dörries, *et al.*, 2004). Weitere wichtige Reservoirs sind Mäuse, Hasen, Kaninchen und Wildvögel, die den Erreger ebenso mit dem Kot ausscheiden (Selbitz, 2001). Die von *Y. pseudotuberculosis* verursachte Pseudotuberkulose ist generell eine seltene Erkrankung, während *Y. enterocolitica* als Auslöser etwa 1 % aller akuten Enteritiden in Europa gilt (Dörries, *et al.*, 2004). 2010 lag die Inzidenz der Yersiniose in Deutschland bei 4,1 Erkrankungen auf 100000 Einwohner. Bei den Infektionsraten zeigt sich eine Häufung von Erkrankungen im Kleinkindalter während sie sich im Erwachsenenalter auf einem konstant niedrigen Niveau halten (Robert-Koch-Institut, 2011). Für Infektionen mit Yersinien gilt in Deutschland eine Meldepflicht für das diagnostizierende Labor (Robert-Koch-Institut, 2011).

1.2 Klinik, Diagnostik und Therapie der Yersiniose

1.2.1 Klinik der Yersiniosen

In der Regel beginnt eine Yersinieninfektion mit der oralen Aufnahme des Erregers mittels kontaminierter Nahrungsmittel oder Wasser. Nach einer Inkubationszeit von drei bis zehn

Tagen kommt es meist zu akuten Enteritiden oder Enterokolitiden. Bei 10 bis 20 % der Patienten kommt es zur Entwicklung eines akuten Abdomens mit Lymphadenitis, akuter terminaler Ileitis oder Pseudoappendizitis. Zumeist ist der Krankheitsverlauf der Yersiniosen aber milde und heilt nach wenigen Tagen bis maximal zwei Wochen ohne ärztliches Eingreifen aus (Dörries, *et al.*, 2004; Schaffner, 1999). Während einer akuten Infektion werden massenhaft Yersinien über den Darm ausgeschieden.

Die durch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* verursachten Yersiniosen lassen sich in unterschiedliche klinische Bilder unterteilen. Die Ausbildung des Krankheitsbildes ist abhängig von Alter, Geschlecht, Gesundheitszustand und Histokompatibilitätstyp des Patienten. Am häufigsten findet sich das Erkrankungsbild des Säuglings und Kleinkindes, mit sich in der Regel selbst limitierender Gastroenteritis mit Fieber, wässrigen bis blutigen Durchfällen und Erbrechen (Lee, *et al.*, 1990). Im späteren Kindes- bis Jugendalter manifestiert sich die Infektion oftmals mit einem pseudoappendizitischen Verlauf mit akuter mesenterialer Lymphadenitis (Ileozökalwinkel), Fieber, abdominellen Schmerzen im rechten unteren Quadranten und seltener mit Durchfällen (Chandler, *et al.*, 1994; Harrison, *et al.*, 1998). Beim Erwachsenen ist eine Yersinieninfektion selten und tritt zumeist in Form blutiger Diarrhöen mit Fieber, Erbrechen und abdominellen Schmerzen auf. Es kann aber auch zu chronisch rezidivierenden Ileokolitiden mit mesenterialer Lymphadenitis kommen, was leicht zur Verwechslung mit Morbus Crohn führen kann (sog. Pseudo-Crohn). In seltenen Fällen kommt es durch geschwollene Lymphknotenpakete zu Invaginationen und Ileussyndromatik (Hildebrandt, *et al.*, 1993). Außerdem ist auch ein leichter Verlauf mit Pharyngitis, Muskelschmerzen und Fieber möglich, der oftmals als grippaler Infekt fehlinterpretiert wird. Selten kommt es bei einer Infektion mit *Y. enterocolitica* zu septischen Verläufen. Diese betreffen vor allem Patienten, die durch konsumierende, immunschwächende Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus, Immunsuppression, Tumorerkrankungen und Leberzirrhose anfälliger sind (Bockemühl, *et al.*, 2004).

In bis zu 30 % der intestinalen Infektionen mit Yersinien kommt es zu aseptischen, immunologischen Begleit- oder Folgeerkrankungen (Heesemann, 1991). Eine wichtige Manifestation stellt die reaktive Arthritis dar, eine sterile Mono- oder Oligoarthritis der großen Gelenke, die sich normalerweise nach vier bis zwölf Wochen wieder zurückbildet (Schaffner, 1999). Als weitere Yersinien-assoziierte Erkrankungen gelten Myalgien, Uveitis anterior, Urtikaria, Morbus Reiter, Sweet-Syndrom, fernöstlich-scharlachähnliches Fieber (*Y. pseudotuberculosis*), Guillain-Barré-Syndrom, Glomerulonephritis und Myokarditis (Köhler, *et al.*, 2001; Schaffner, 1999). Die reaktive Arthritis, das

Erythema nodosum, die Uveitis anterior und seltener eine Thyreoiditis sind deutlich mit dem HLA B27-Allel assoziiert (85-95 % der betroffenen Patienten) und betreffen vor allem junge Erwachsene (Dörries, *et al.*, 2004).

1.2.2 Diagnostik

Zur Diagnostik der Yersiniose sind verschiedene Verfahren möglich. Das wichtigste stellt der Erregernachweis aus dem Stuhl des Patienten dar, welcher aber nicht immer gelingt. Bei akuten Enteritiserkrankungen wird die Stuhlprobe auf CIN-Agar ausgestrichen und bei 28 °C über 24 bis 48 Stunden bebrütet. Bei symptomlosen Ausscheidern und Patienten mit terminaler Ileitis, Lymphadenitis, Pseudoappendizitis oder postinfektiöser Arthritis setzt der erfolgreiche Nachweis oftmals eine Kälteanreicherung voraus (Bockemühl, *et al.*, 2004). Dahingegen gelingt die Erregerisolation aus Operationsmaterial wie Dünndarmbiopsaten oder Lymphknoten und Appendix leicht (Dörries, *et al.*, 2004). Endoskopisch und histologisch sind bei einer vorliegenden Yersiniose oberflächliche aphtoide Ulzerationen von Ileum und Kolon zu erkennen. Eine Serokonversion lässt sich durch den Nachweis agglutinierender Antikörper gegen O- und H-Antigene bestätigen. Seit einigen Jahren ist auch der Nachweis spezifischer Antikörper (IgG, IgA und IgM) gegen *Yersinia outer proteins* (sog. Yops, s.u.) im Immunoblot möglich. Die Interpretation der Ergebnisse kann durch Kreuzreaktionen erschwert werden, zur Diagnose einer Folgeerkrankung ist der serologische IgA-Nachweis aber notwendig (Heesemann, *et al.*, 1989). Bei septischer Symptomatik kann eine Erregerisolierung aus dem Blut des Patienten erfolgen. Weitere Nachweismethoden stellen indirekte Hämagglutinationstests, PCR und ELISA dar (Bockemühl, *et al.*, 2004).

1.2.3 Therapie

Eine antibiotische Therapie wird bei unkomplizierter intestinaler Yersiniose nicht empfohlen, da diese im Allgemeinen selbstlimitierend ist. In diesen Fällen erfolgt höchstens eine Therapie mit symptomatischen Maßnahmen wie oraler Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution. Bei extraintestinalen Manifestationen oder septischen Verläufen, ebenso wie bei intestinalen Infektionen abwehrschwacher Patienten (Leberzirrhose, hämolytische Anämie u.a.) muss eine antibiotische Therapie erfolgen. Hierfür eignen sich Fluorchinolone oder Cephalosporine der III. Generation (Cover, *et al.*, 1989; Herold, 2011). Alternativ können auch Cotrimoxazol,

Aminoglykoside, Gyrasehemmer oder Doxycyclin gegeben werden (Harrison, *et al.*, 1998; Hoogkamp-Korstanje, 1987; Scavizzi, *et al.*, 1996; Schaffner, 1999). Aufgrund der induzierbaren β -Laktamase-Aktivität zeigen Breitbandpenicilline und Cephalosporine der I. und II. Generation besonders bei *Y. enterocolitica* keine Wirkung (Cover, *et al.*, 1989). Bis heute ist nicht geklärt, ob sich die Entwicklung der immunpathologischen Folgeerkrankungen durch eine Antibiotika-Therapie positiv beeinflussen lässt (Herold, 2011).

1.3 Pathogenese und Pathogenitätsprinzip

1.3.1 Invasion und Dissemination

Yersinien gelangen durch orale Aufnahme in den Wirtsorganismus und damit zunächst in den Magen. Um ein Überleben im sauren Magenmilieu zu ermöglichen, exprimieren sie eine Urease (de Koning-Ward, *et al.*, 1995; Gripenberg-Lerche, *et al.*, 2000). Den entscheidenden Faktor für den weiteren pathogenetischen Infektionsverlauf stellt im Dünndarm das mukosaassoziierte lymphatische Gewebe (oder gut associated lymphatic tissue, GALT) dar. Unter diesem Begriff versteht man Lymphfollikel in der Darmwand, die einzeln oder als Follikelaggregate im terminalen Ileum (sog. Peyersche Plaques) auftreten. Diese werden von, dem follikelassoziierten Epithel (FAE) bedeckt. Es enthält verglichen mit anderen Darmregionen kaum schleimproduzierende Zellen oder Panethsche Körnerzellen, welche Defensin und Lysozym produzieren (Giannasca, *et al.*, 1994). Entscheidender Bestandteil des FAE sind die M-Zellen, die sich durch eine nur dünne Glycokalix und einen gering ausgeprägten Bürstensaum auszeichnen (Kraehenbuhl, *et al.*, 2000; Neutra, *et al.*, 1996). An ihrer basalen Seite finden sich tiefe zytoplasmatische Einziehungen, in welchen sich Makrophagen und Lymphozyten ansammeln. Apikal exprimieren die M-Zellen β_1 -Integrine (Clark, *et al.*, 1998). Sie nehmen intestinale Antigene auf und überführen sie in die subepitheliale Domregion der Peyerschen Plaques, wo sich dendritische Zellen finden (Neutra, 1999). Letztere reifen durch den Antigenkontakt und induzieren nachfolgend eine Immunantwort in der interfollikulären T-Zellzone der Peyerschen Plaques (Didierlaurent, *et al.*, 2002). Mehrere Studien zeigten, dass enteropathogene Yersinien sowie einige andere Erreger die M-Zellen als Eintrittspforte in den Wirtsorganismus nutzen (Autenrieth, *et al.*, 1996; Grutzkau, *et al.*, 1990). Die Yersinien adhärieren an die Wand des Dünndarms und das auf ihrer Oberfläche exprimierte Invasin bindet an die β_1 -Integrine der M-Zellen, was zur

Transzytose der Bakterien aus dem Darmlumen in die Lymphfollikel der Peyerschen Plaques führt (Clark, *et al.*, 1998; Isberg, *et al.*, 1990). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass nur enteropathogene aber keine apathogenen Stämme in der Lage sind, M-Zellen zu invadieren (Carter, 1975; Hanski, *et al.*, 1989a). Allerdings schließt man aus Versuchen mit *Invasin*-negativen Mutanten, dass es auch *Invasin*-unabhängige Invasionsmechanismen gibt. Es hat sich gezeigt, dass *Inv*-defiziente Mutanten ebenso in der Lage sind Peyersche Plaques zu invadieren, wenn auch mit einer mehrtägigen Verzögerung, und dass die LD₅₀ für die Mutanten und den Wildtyp sogar gleich ist (Pepe, *et al.*, 1993). Die Yersinien sezernieren in der subepithelialen Domregion und den Lymphfollikeln die *Yersinia outer Proteins* (Yops), was die Phagozytose durch Immunzellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen hemmt und so die extrazelluläre Proliferation ermöglicht (Cornelis, *et al.*, 1998; Cornelis, 2002; Simonet, *et al.*, 1990). Nachfolgend bilden sich nach Einstrom neutrophiler Granulozyten in die infizierten Peyerschen Plaques Mikroabszesse mit lebenden extrazellulären Bakterien aus, was schließlich zur vollständigen Zerstörung der zytoarchitektonischen Struktur der Peyerschen Plaques und zu einer zunehmenden Schädigung der betroffenen Darmabschnitte führen kann (Autenrieth, *et al.*, 1996; Hanski, *et al.*, 1989a). Die Yersinien breiten sich von den Peyerschen Plaques weiter in die mesenterialen Lymphknoten aus. Im Mausmodell beobachtet man zudem eine typische Dissemination in Milz und Leber mit Abszessbildung (Carter, 1975). Nach einigen Tagen kommt es durch bislang ungeklärte Mechanismen dazu, dass die enteropathogenen Yersinien von der Abwehr des Wirtsorganismus überwältigt werden und somit zum selbstlimiterenden Verlauf der Erkrankung (Aepfelbacher, *et al.*, 1999).

1.3.2 Abszessbildung durch *Y. enterocolitica*

Wie beschrieben kommt es in den Peyerschen Plaques zur Vermehrung der Yersinien und infolge zur Bildung von Abszessen, die anfänglich vor allem aus neutrophilen Granulozyten bestehen. Im Verlauf kommt es zur Einwanderung mononukleärer Zellen, wodurch sich die Struktur der Abszesse granulomatös verändert (Autenrieth, *et al.*, 1993b). Auch die Abszesse in Milz und Leber nehmen diese Entwicklung (Carter, 1975). Lange Zeit ging man davon aus, dass die Abszesse in den Peyerschen Plaques jeweils durch viele über die M-Zellen invadierten Bakterien hervorgerufen würden (Chandler, *et al.*, 1994). Versuche zur Oralinfektion mit einer Infektionsdosis, die zu gleichen Teilen aus mit GFP (*green fluorescent*

protein)- und RFP (*red fluorescent protein*)-markierten Yersinien bestand, führten allerdings zu einem anderen Schluss. Hier zeigten sich in den Peyerschen Plaques, Milzen und Lebern nur einfarbig fluoreszierende Kolonien, was die Vermutung nahe legt, dass Yersinien-Abszesse durch die klonale Vermehrung nur eines Bakteriums entstehen (monoklonale Abszessbildung) (Oellerich, *et al.*, 2007).

1.4 Virulenzfaktoren

Yersinien haben im Laufe ihrer Entstehung eine Reihe an Virulenzstrategien entwickelt, um sich gegen Zellen der angeborenen Immunantwort des Wirtes zu schützen. Diese Virulenzfaktoren wirken auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten in vielfältiger Weise, so induzieren sie Apoptose und inhibieren Phagozytose, oxidativen Burst und die Freisetzung von TNF α und INF γ (Cornelis, *et al.*, 1998). Sie ermöglichen dem Erreger somit das Eindringen und Überleben im Wirtsorganismus. Die Virulenzfaktoren der humanpathogenen Yersinien sind zum einen Teil chromosomal kodiert, zum anderen liegen sie auf dem 70 kb großen stark konservierten (55-90 %) Virulenzplasmid pYV (*plasmid involved in Yersinia virulence*) (Revell, *et al.*, 2001). Zu den chromosomalen Faktoren, welche die Virulenz der enteropathogenen Yersinien entscheidend beeinflussen, gehören die Außenmembranproteine Inv (*Invasin*), Ail (*attachment invasive locus*) und Myf (*mucooid yersinia fibrillae*), das sezernierte und hitzestabile Enterotoxin Yst und das Yersiniabactin-Siderophorsystem FyuA mit Irp1-9, welches auf einer HPI (*high pathogenicity island*) kodiert ist (Cornelis, *et al.*, 1998; Delor, *et al.*, 1992; Perry, *et al.*, 1999). Trotz dieser chromosomalen Virulenzfaktoren ist die Pathogenität der Yersinien unabdingbar abhängig vom Vorhandensein des pYV-Virulenzplasmids, welches in *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* Biovar 1B, und 2-5 vorkommt. Es trägt Gene für die Synthese eines Typ III-Sekretionssystem (T3SS), der „*Yersinia outer proteins*“ (Yops), und des *Yersinia*-Adhäsins (YadA), sowie für das Lipoprotein YlpA, dessen Rolle in der Pathogenität bis heute ungeklärt ist (Heesemann, *et al.*, 2006; Revell, *et al.*, 2001). Der bei 37 °C exprimierte Aktivator VirF (LcrF) steuert temperaturabhängig die Expression der plasmidkodierten Virulenzfaktoren (Lambert de Rouvroit, *et al.*, 1992).

Im Folgenden werden die wichtigsten Virulenzfaktoren genauer erläutert, wobei auf die Adhäsionsproteine unter 1.5 genauer eingegangen wird.

1.4.1 Typ3-Sekretions-System

Das *Yersinia* T3-Sekretions-System (T3SS) wird auch als *Ysc*-Injektisom bezeichnet (als Übersicht: Cornelis, 2002). Es setzt sich aus 29 *Ysc*-Proteinen zusammen, von denen zehn hochkonserviert sind (*YscD*, *J*, *L*, *N*, *Q*, *R*, *S*, *T*, *V* und *U*) und im Flagellenapparat und jedem bekannten T3SS vorkommen. Das Injektisom gliedert sich in zwei Teile: einen Basalkörper, der die Peptidoglykanschicht, die innere und äußere Membran durchspannt und eine externe, einer Nadel ähnliche, Struktur (Cornelis, 2002; Hoiczyk, *et al.*, 2001). Beim Basalkörper unterscheidet man einen oberen und einen unteren Teil. Das *YscC*-Protein, ein porenbildendes Protein aus der Familie der Sekretine, bestimmt den oberen Teil und ist in die äußere Membran integriert. Der untere Teil bildet die Basis für den aktiven Transport. An der Basis des Basalkörpers interagiert *YscQ*, mit *YscN*, einer ATPase, die die Energie für die Sekretion liefert (Jackson, *et al.*, 2000). Die Nadel hat eine Länge von 60-80 nm und wird aus dem Nadelprotein *YscF* gebildet (Cornelis, 2002). Die Länge der Nadel wird vom Längenkontrollprotein *YscP* bestimmt. Die Spitze der Nadel wird vom Protein *LcrV* gebildet, das zusammen mit *YopB* und *YopD* die für die Sekretion notwendige Translokationspore in der Wirtszellmembran bildet (Roggenkamp, *et al.*, 1995b). *LcrV* ist gemeinsam mit *YopB* und *YopD* notwendig für die Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle, weswegen sie auch als Translokationsproteine bezeichnet werden (Cornelis, 2002; Galan, *et al.*, 2006).

1.4.2 Yops

Yersinien verfügen über sog. *Yersinia Outer Proteins* (Yops). Anhand ihrer Funktion unterscheidet man Yops in Translokatoren, Regulatoren und Effektorproteine (Cornelis, *et al.*, 1997). Die Effektorproteine werden vermutlich nach Kontakt der Bakterien mit der Wirtszelle durch das Typ III-Sekretionssystem in das Zytosol dieser Zelle injiziert. Dort blockieren sie Signalkaskaden und Veränderungen des Zytoskeletts, die für die Wirtsabwehr wichtig sind (Cornelis, 2002). So können Yops die Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten hemmen und die Suppression natürlicher Killerzellen und die Apoptoseinduktion in Makrophagen bewirken (Bliska, *et al.*, 1995; Kerschen, *et al.*, 2004; Mills, *et al.*, 1997). Zu den Translokatoren zählt man *YopB*, *YopD* und *LcrV* (V-Antigen), welche an der Bildung des Sekretionsapparates beteiligt sind, wodurch sie für die

Translokation der Effektorproteine notwendig sind (Cornelis, *et al.*, 1997). LcrV wirkt zudem auch immunsuppressiv indem es die Synthese von TNF- α und Interferon- γ durch Induktion der IL-10-Produktion in Makrophagen hemmt (Nakajima, *et al.*, 1995; Sing, *et al.*, 2002). Die Regulatoren LcrF und YscM kontrollieren die Translokation der Effektorproteine (Forsberg, *et al.*, 1991; Holmstrom, *et al.*, 1997).

1.4.3 Invasin

Invasin ist ein wichtiger Invasionsfaktor enteropathogener *Yersinia*-Spezies. In vitro wird Invasin bei 26 °C und einem pH-Wert von 8,0 maximal exprimiert (Isberg, *et al.*, 1988). Allerdings zeigt sich bei einem pH-Wert von 5,5 und erhöhter Osmolarität eine ähnlich starke Expression auch bei einer Temperatur von 37° C, was den Umgebungsumständen im intestinalen Lumen ähnelt (Pepe, *et al.*, 1994). Die entsprechende Expressions-Regulation des auf dem chromosomalen *inv*-Gen kodierten Invasins geschieht durch den Regulator RovA (Nagel, *et al.*, 2001). Die Analyse der Kristallstruktur des Invasin von *Y. pseudotuberculosis* zeigte, dass es sich um ein 18 nm großes, stabförmiges Protein mit fünf Domänen (D1 - D5) handelt. Seine Struktur ähnelt den integrinbindenden Bereichen von Fibronektin (Hamburger, *et al.*, 1999). Als nicht-fimbrilläres Außenmembranprotein ist es N-terminal in der bakteriellen Außenmembran verankert, während sein C-terminaler Teil die extrazelluläre Domäne ausbildet (Isberg, *et al.*, 2000). Sie vermittelt die Bindung an β 1-Integrine auf M-Zellen der Peyerschen Plaques und induziert damit eine effektive Internalisierung und Translokation der Yersinien (Clark, *et al.*, 1998; Grutzkau, *et al.*, 1990). So trägt es zur Translokation der Bakterien vom Darmlumen in die subepithelialen Gewebe bei, wodurch es in der Frühphase einer Infektion bedeutend ist. Im Tierversuch zeigte sich, dass Invasin zur Durchdringung enteraler M-Zellen notwendig ist (Pepe, *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den enteropathogenen *Yersinia*-Spezies zeigt sich bei *Y. pestis* ein 708 bp langes Insertionselement im *inv*-Gen, durch welches die Invasion in Wirtszellen blockiert wird (Simonet, *et al.*, 1996).

1.4.4 Weitere Virulenzfaktoren

Y. enterocolitica exprimiert das chromosomal kodierte Außenmembranprotein Ail (attachment invasive locus) unter aeroben Bedingungen bei 37 °C auf seiner Membranoberfläche (Pierson, *et al.*, 1993). Ail ist mit verantwortlich für die Serumresistenz

der Yersinien und fördert die Invasion in Epithelzellen (Bliska, *et al.*, 1992; Pierson, *et al.*, 1993). Bei In-vitro-Studien mit *Ail*-negativen Yersinien zeigten sich diese erheblich weniger invasiv als die Wildtyp-Kontrollen. Im Mausmodell fanden sich allerdings keine entsprechenden Unterschiede, weswegen man davon ausgehen muss, dass *Ail* für die Invasion und systemische Ausbreitung der Bakterien im Wirt nicht von entscheidender Bedeutung ist (Pepe, *et al.*, 1995; Wachtel, *et al.*, 1995).

Bei einem pH-Wert von 6 und einer Temperatur von 37 °C exprimieren pathogene *Y. enterocolitica*-Serotypen das *myf*-Antigen (*mucoïd yersinia fibrillae*). Es lässt sich in elektronenmikroskopischen Untersuchungen als eine fibrillenähnliche Struktur auf der bakteriellen Oberfläche darstellen (Iriarte, *et al.*, 1993). Bislang ist noch nicht geklärt inwiefern das *myf*-Antigen eine pathogenetische Funktion für *Y. enterocolitica* besitzt, allerdings wird es ausschließlich von humanpathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen exprimiert (Lindler, *et al.*, 1990). Ein Myf-ähnliches Protein wird auch von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* produziert (pH6 Antigen Psa).

Pathogene Yersinien synthetisieren im Darmlumen das hitzestabile Enterotoxin Yst (Delor, *et al.*, 1990). Die Expression des hitzestabilen Toxins Yst erfolgt unter normalen Kulturbedingungen nur bei 30 °C. Erst nach Ansäuerung des pH-Werts oder einer erhöhten Salzkonzentration wird Yst auch bei 37 °C ausreichend exprimiert (Mikulskis, *et al.*, 1994). Im Tiermodell konnte die Beteiligung von Yst an der wässrigen Diarrhöe bei mit Yersinien infizierten Kaninchen durch Stimulation der cGMP-Synthese im intestinalen Bürstensaum gezeigt werden (Delor, *et al.*, 1992).

Eisen ist für die Bakterien als entscheidender Bestandteil vieler Stoffwechselprozesse von hoher Bedeutung. Um eine suffiziente Eisenversorgung sicherzustellen, sezernieren Maus-virulente Yersinien sogenannte Siderophore. Hierbei handelt es sich um niedermolekulare Komplexbildner, die dreiwertiges Eisen hochaffin binden. Die Synthesegene des *Yersiniabactin*-Siderophorsystems sind auf einer HPI kodiert (Carniel, *et al.*, 1996). Diese kommt in *Y. enterocolitica* ausschließlich bei hoch-mauspathogenen Serogruppen vor, weswegen man sie als Virulenzfaktor wertet (Chambers, *et al.*, 1994; Heesemann, *et al.*, 1993; Heesemann, 1987).

1.5 Adhäsine

Ein wichtiger bakterieller Virulenzfaktor sind die Adhäsine. Sie vermitteln die Anhaftung der Keime an Fremdoberflächen, indem sie eine physikalische Entfernung zwischen Keim und Oberfläche zum Beispiel durch hydrodynamische Scherkräfte vermindern. Da die Adhäsine hochspezifisch für bestimmte Oberflächenstrukturen sind, schaffen sie für Bakterien zusätzliche Verbreitungsoptionen und bestimmen damit gleichzeitig die Ausbreitung bestimmter Keime in dem für sie typischen Milieu. So ermöglichen es bestimmte Adhäsine *E. coli* einerseits den Harntrakt zu kolonisieren, andererseits durch weitere Adhäsine den Darmtrakt vieler unterschiedlicher Säugetiere zu kolonisieren (Svanborg, *et al.*, 1994). An diesem Beispiel zeigt sich, dass vor allem die Adhäsion-Ausstattung eines Keims die Grenzen seines Lebensraums vorgibt und somit zur Besetzung spezieller Nischen führt, da eine Kolonisierung und Vermehrung nur dort möglich ist, wo sich die Bakterien anhaften können. Die Anhaftung des Bakteriums an die Wirtszelle ist notwendig für die ersten Schritte einer Infektion. Die Bindung führt bei invasiven Erregern zur Internalisierung durch Phagozytose oder Makropinozytose, bei nicht invasiven Erregern zu Kolonisierung des Darmepitheliums (z. B. enteroaggregative *E. coli*, EAEC) (Finlay, *et al.*, 1997). Bakterienadhäsine können in Fimbrien-Adhäsine (Fimbrien und Pili) und Nicht-Fimbrien-Adhäsine eingeteilt werden.

1.5.1 Fimbrien und Pili

Fimbrien oder Pili, dünne helikale homopolymere Fasern aus Fimbrin, sind die am besten untersuchten bakteriellen Adhäsine gramnegativer Bakterien (Klemm, 1994). Sie haben eine Länge von etwa 1 µm, unterscheiden sich aber in ihrer Struktur. Typ1-Pili sind stabähnliche, P-Pili helikoidale Polymere. Pili bestehen aus einem Hauptteil, der sich aus vielen identischen Kopien eines Strukturproteins zusammensetzt, und einer Pilus-Spitze, die das eigentliche Adhäsion darstellt. So bestehen Typ1-Fimbrien beispielsweise hauptsächlich aus *FimA*-Strukturproteinen, während das an der Pilus-Spitze eingebaute FimH der Adhäsion dient. Die Pilus-Proteine werden einzeln im periplasmatischen Raum synthetisiert und dann von Chaperonen gebunden und zur Außenmembran transportiert. Dort erfolgt progradient die Piluspolymerbildung, die unterhalb der Pilus-Spitze beginnt.

1.5.2 Nicht-Fimbrien-Adhäsine

Zur Gruppe der Nicht-Fimbrien-Adhäsine (nf-Adhäsine) zählt man alle Adhäsine gramnegativer Erreger, die in der äußeren Membran verankert und nicht durch zusätzliche Bausteine verlängert sind. Auch diese nf-Adhäsine ermöglichen eine Kolonisierung unterschiedlicher Wirtszellen. Dies sind beispielsweise das AfaD und AfaE von *E. coli*, das filamentöse Hämagglutinin von *Bordetella pertussis*, die Adhäsine Hap und Hia von *Haemophilus influenzae*, die Opa-Proteine (*opacity proteins*) der Neisserien, sowie Mitglieder der Oca-Familie wie YadA (Barenkamp, *et al.*, 1992; Fink, *et al.*, 2001; Hoiczyk, *et al.*, 2000; Jouve, *et al.*, 1997; Relman, *et al.*, 1989; St Geme, *et al.*, 2000). Die meisten nf-Adhäsine mit N-terminaler oder C-terminaler Extension gehören den monomeren oder trimeren Autotransporterfamilien an.

1.5.3 Sekretionssysteme und Autotransporter

Der Proteintransport in den Extrazellulärraum gestaltet sich durch das Vorhandensein einer inneren und einer äußeren Membran bei gramnegativen Bakterien deutlich komplexer als bei grampositiven Bakterien, was zur Entwicklung unterschiedlicher Proteinsekretionsmechanismen geführt hat. Die verschiedenen Sekretionssysteme werden in die Typen I – VI und den Chaperon Usher-Weg unterteilt (Dautin, *et al.*, 2007; Pukatzki, *et al.*, 2006). Typ I bis IV und Typ VI stellen unterschiedliche makromolekulare Proteinkomplexe dar, welche Transportsysteme oder Kanäle im periplasmatischen Raum bilden, wodurch sie Innen- und Außenmembran verbinden. Die Transportwege können weitergehend in *Sec*-abhängige und *Sec*-unabhängige Transporter unterschieden werden. Zu Ersteren zählt man das Typ II- und das Typ V-System und den Chaperon Usher-Weg. Mittels dieser werden Proteine aus dem Periplasma über die äußere Membran transportiert, welche eine N-terminale Signalsequenz tragen, die eine Translokation der Proteine über den *Sec*-Apparat ins Periplasma vermittelt und dabei abgespalten wird. Die Typ I-, Typ III-, Typ IV- und Typ VI-Systeme stellen *Sec*-unabhängige Systeme dar, was die sezernierten Substrate betrifft, wobei der Sekretionsapparat *Sec*-abhängig aufgebaut wird (Papanikou, *et al.*, 2007). Der auch als Autotransporter-System bezeichnete Sekretionstyp V umfasst die konventionellen Autotransporter (N-terminale Membrananker) (V a), das Zwei-Partner-Sekretionssystem („two partner system“-TPS) (V b) und die trimeren Autotransporter (C-terminale Membrananker) (V c). Im Gegensatz zu den Systemen I, II, III, IV und VI sind die

Autotransporter relativ unkompliziert strukturiert, da alle notwendigen Informationen für die Translokation im Protein der äußeren Membran selbst enthalten sind (Henderson, *et al.*, 2004). Entsprechend haben alle Autotransporter einen homologen Aufbau, welcher sich aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer sog. Passagier-Domäne und einem C-terminalen oder N-terminalen Translokator zusammensetzt. Die Signalsequenz dient der *Sec*-abhängigen Translokation durch die Innenmembran, die Passagier-Domäne stellt den exprimierten Teil des Proteins dar, während der Translokator eine Pore aus β -Faltblättern („ β -barrel“) in der Außenmembran bildet (Henderson, *et al.*, 1998). Für den bislang noch ungeklärten Translokations-Mechanismus der Passagier-Domäne durch die Außenmembran wurden drei unterschiedliche Modelle vorgestellt. Beim multimeren Modell nimmt man an, dass die Passagier-Domäne bereits anteilig im Periplasma gefaltet wird und dann durch einen multimeren Komplex aus „ β -barrel“-Poren über die Außenmembran transportiert wird (Veiga, *et al.*, 2002). Auch bei dem *Omp85*-Modell geht man von einer anteiligen Faltung der Passagier-Domäne im Periplasma aus, stellt sich aber eine Translokation derselben und die Integration der β -Domäne durch das Außenmembranprotein *Omp85/YaeT* vermittelt vor (Voulhoux, *et al.*, 2003; Voulhoux, *et al.*, 2004). Das „Hairpin-Modell“ schlägt eine Schleifenbildung des C-Terminus der Passagier-Domäne in der Pore vor, danach würde das Protein N-terminal durch die Pore transloziert (Oomen, *et al.*, 2004). Die Passagier-Domäne, die danach auf der Oberfläche exponiert ist, wird im klassischen Fall proteolytisch oder autokatalytisch abgespalten und dann ins extrazelluläre Milieu abgegeben, wie etwa die IgA-Protease von *N. gonorrhoeae* oder aber sie bleibt nicht kovalent am „ β -barrel“ gebunden, wie es bei dem AIDA-I-Protein von *E. coli* der Fall ist (Benz, *et al.*, 1992; Pohlner, *et al.*, 1987). Die TPS-Subgruppe grenzt sich durch seine besondere Struktur ab, da in diesem Fall zwei separate Proteine synthetisiert werden. Das Erste, *TpsA* (sog. Exotoxin), fungiert dabei als Passagier-Domäne während die Translokator-domäne *TpsB* ein „ β -barrel“ in der Außenmembran bildet. Das ungefaltete *TpsA* kann aufgrund eines spezifischen Sekretionssignals in die *TpsB*-Pore eingefädelt werden und faltet sich danach auf der Bakterienoberfläche (Jacob-Dubuisson, *et al.*, 2001; Jacob-Dubuisson, *et al.*, 2004). Die dritte Untergruppe stellen die sog. Oca-Proteine („oligomeric coiled-coil adhesins“) dar, die auch als trimere Autotransporter-Adhäsine (TAA) bezeichnet werden (siehe 1.5.4) (Cotter, *et al.*, 2005; Hoiczky, *et al.*, 2000; Roggenkamp, *et al.*, 2003). Sie unterscheiden sich durch ihren speziellen Aufbau, aus drei identischen Monomeren, und ihr Sekretionsmodul von den anderen Autoransportersystemen (Henderson, *et al.*, 2004; Kim, *et al.*, 2006; Roggenkamp, *et al.*, 2003). Alle bisher charakterisierten Autotransporter stellen Virulenzfaktoren dar. Dabei

finden sich unter ihnen Proteine, die Aktin-gesteuerte bakterielle Motilität oder enzymatischen Funktion, wie etwa eine Protease-Funktion, vermitteln oder sie wirken als Adhäsine, Toxine oder Immunmodulatoren (Henderson, *et al.*, 1998; Henderson, *et al.*, 2001).

1.5.4 Die Oca-Familie

Die Oca-Proteine haben charakteristischerweise eine trimere Struktur aus einer N-terminalen Kopfreion, welche im Vergleich verschiedener Oca-Proteine eine unterschiedliche Anzahl repetitiver Elemente aufweist, einer längenmäßig variierenden Stiel-domäne mit trimerisierter helikaler Struktur (Kollagen-ähnlich) („*coiled coils*“) und einer hochkonservierten C-terminalen Membranankerdomäne, welche sich aus einem linkshändigen *coiled-coil* Segment (sog. *linker*-Bereich), gefolgt von vier amphipatischen transmembranen β -Faltblattstrukturen am C-Terminus des Proteins zusammensetzt. Weitere hochkonservierte Strukturelemente stellen die N-terminale Sec-abhängige Sekretionssequenz, sowie die Konnektor-Domäne, welche die Kopf- mit der Stiel-Region verbindet, dar (Hoiczky, *et al.*, 2000; Szczesny, *et al.*, 2008). Alle bislang näher untersuchten Oca-Proteine (YadA, Hia, NadA, UspA1, UspA2, DsrA, Eib-Proteine) bilden hitzestabile Trimere.

Die trimeren Autotransporter werden zunächst wie die konventionellen Autotransporter über den Sec-Apparat sezerniert. Folgend bilden sie das „ β -barrel“, das aus drei identischen Monomeren mit jeweils vier β -Faltblättern besteht (Cotter, *et al.*, 2005; Dautin, *et al.*, 2007). Entscheidend für die Bildung eines funktionalen Translokators ist hierbei der C-terminale Bereich des Membranankers (~ 70 AS) (Roggenkamp, *et al.*, 2003). Außerdem fehlt den trimeren Autotransportern eine vielen konventionellen Autotransportern (z. B. BrkA von *Bordetella pertussis*) eigene intramolekulare Chaperon-Domäne, welche die extrazelluläre Abspaltung der Passagier-Domäne bewirkt (Surana, *et al.*, 2004). Die Passagier-Domäne der trimeren Autotransporter bleibt vielmehr nach dem Transport durch die Außenmembran an der Translokator-Domäne kovalent gebunden (Cotter, *et al.*, 2005).

YadA gilt als Prototyp der Oca-Proteine (Ackermann, 2005; Hoiczky, *et al.*, 2000). Mittels Sequenzvergleichs fanden sich YadA-homologe Proteine in verschiedenen Subdivisionen der *Proteobacteria* wie zum Beispiel in den für Menschen pathogenen Subdivisionen der β -*Proteobacteria*, wie *Neisseria meningitidis* (NadA), und γ -*Proteobacteria*, wie *Escherichia coli* (Eib-Proteine), *Haemophilus influenzae* (Hia) und *Haemophilus ducreyi* (DsrA) (Comanducci, *et al.*, 2002; Elkins, *et al.*, 2000; Sandt, *et al.*, 2000; Surana, *et al.*,

2004). Im Folgenden (unter 1.5.6) soll der strukturelle Aufbau von YadA als Prototyp für die gesamte Oca-Gruppe erklärt werden.

1.5.5 Das *Yersinia*-Adhäsın A (YadA)

YadA, ein membranständiges Adhäsın, war früher auch unter den Bezeichnungen P1 oder Yop1 bekannt (Heesemann, 1987; Skurnik, *et al.*, 1989). Das für YadA kodierende *yadA*-Gen (früher *yopA*-Gen) liegt, wie auch die Gene für das Typ III-Sekretionssystem und dessen Yops, auf dem 70 kb großen Virulenzplasmid pYV und ist in den meisten *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* Stämmen vorhanden, für die es einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt (Skurnik, *et al.*, 1989). Die Expression von YadA erfolgt bei 37°C durch den Transkriptionsaktivator VirF (LcrF) (Skurnik, *et al.*, 1992). Unter in vitro-Bedingungen erreicht man die höchste Expressionsrate bei einer Anzucht in Minimalmedium (Kapperud, *et al.*, 1985). YadA ist bereits zwei Minuten nach einer Temperaturerhöhung auf 37°C auf der äußeren Membran nachweisbar, was als Hinweis auf seine Pathogenität im inneren Milieu des Wirts gewertet werden kann (Kapperud, *et al.*, 1985). Im Vergleich zu den enteropathogenen Yersinien zeigt sich bei *Y. pestis* die Deletion eines Basenpaares zu Beginn der kodierenden Region des *yadA*-Gens, welche zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit zur Entstehung eines Stopcodons führt, was die Expression des Gens unterbindet (Rosqvist, *et al.*, 1988).

1.5.6 Struktur von YadA

Der Vergleich der YadA-Sequenzen verschiedener *Y. enterocolitica*- (Serotypen O3 und O8) und *Y. pseudotuberculosis*-Stämme (Serotyp III) zeigte, dass es sich bei YadA um ein Polypeptid aus 422-455 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 41-44 kDa handelt (Skurnik, *et al.*, 1989). In der SDS-PAGE bildet das Protein hitzestabile Aggregate im Größenbereich von 160 – 240 kDa, von denen gezeigt werden konnte, dass sie eine Oligomerisierung von drei identischen Monomeren darstellen, die das vollständige YadA bilden (El Tahir, *et al.*, 2001). Durch die elektronenmikroskopische Darstellung und Aminosäuresequenzanalyse von YadA gelang es weitere Aussagen über seine Proteinstruktur zu treffen. YadA stellte sich als 23 nm lange „Lollipop“-ähnliche Oberflächenstruktur auf der Außenmembran der Yersinien dar (siehe Abb. 1) (Hoiczyk, *et al.*, 2000).

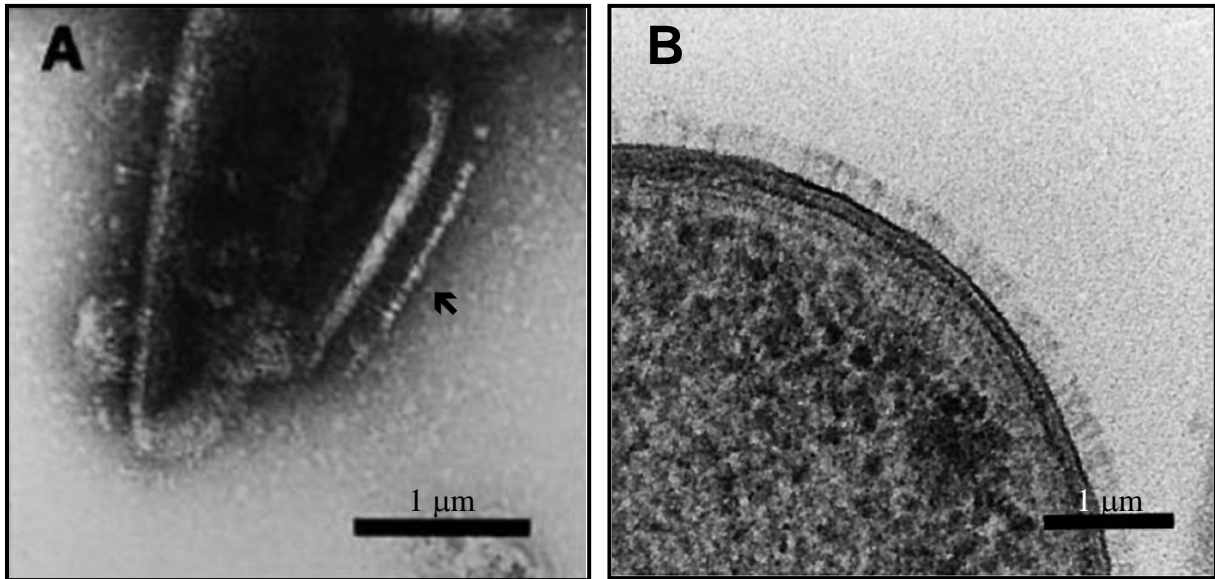


Abb.1: Elektronenmikroskopischer Nachweis von YadA auf der Außenmembran von *Y. enterocolitica* O:8 nach Hoiczcyk et al. 2000

A: Ultrastrukturanalyse der negativ markierten Zellhülle von WA-314, YadA kann in Form „Lollipop“-ähnlicher Strukturen auf der bakteriellen Zelloberfläche nachgewiesen werden (Pfeil); B: YadA bedeckt die Zelloberfläche des Stamm WA-314.

In der Zusammenschau mit Versuchen mit C- und N-terminal verkürzten YadA-Mutanten ließ sich eine Unterteilung des Proteins in drei Hauptdomänen vornehmen, sowie Rückschlüsse auf die verschiedenen Funktionen der einzelnen Domänen ableiten (Roggenkamp, *et al.*, 1995a; Roggenkamp, *et al.*, 1996; Tamm, *et al.*, 1993). Demnach besteht YadA aus einer N-terminalen „Lollipop“-förmigen Kopfdomäne, einer je nach Serotyp unterschiedlich langen Stiel-domäne und einem C-terminalen Membrananker (siehe Abb. 2) (Hoiczcyk, *et al.*, 2000; Roggenkamp, *et al.*, 2003).

Die Kopfdomäne setzt sich aus neun parallelen linkshändigen β -Faltblatt-Strukturen pro Monomer zusammen und vermittelt unter anderem die Kollagenbindungsfähigkeit von YadA (Nummelin, *et al.*, 2004; Tahir, *et al.*, 2000). Kopf- und Stiel-Domäne werden durch die YadA-Konnektordomäne verbunden, die im trimeren YadA drei Haarnadelähnliche Strukturen ausbildet (Nummelin, *et al.*, 2004). Die YadA-Stiel-Domäne setzt sich aus rechtshändigen „coiled-coils“ zusammen, welche je nach Serotyp aus 6 – 9 „15mer repeats“ besteht. Der C-terminale YadA-Membrananker ist eine hochkonservierte Struktur, die sich aus vier amphipatischen transmembranen β -Faltblatt-Strängen pro Monomer zusammensetzt, welche im trimeren YadA eine 12-strängige Pore in der äußeren Membran bilden und damit YadA in derselben verankern (Ackermann, 2005; Koretke, *et al.*, 2006). Entscheidend für die Verankerung ist hierbei vor allem der hydrophobe Charakter des C-Terminus (Tamm, *et al.*,

1993). Spektroskopische Untersuchungen des Membranankers zeigten, dass dieser nicht nur aus β -Faltblatt-Strukturen besteht, sondern N-terminal zudem einen α -helikalen Abschnitt enthält, welcher auch als Linker bezeichnet wird. Dieser bildet eine linkshändige „coiled-coil“-Struktur, die die Transmembranpore verschließen kann und dadurch die starke Hitzestabilität und die Protease-Resistenz vermittelt (Wollmann, *et al.*, 2006). Natives YadA ist äußerst stabil. So konnte gezeigt werden, dass Yersinien sogar nach 20-minütiger Inkubation bei 80°C oder nach Proteasebehandlung noch an Kollagen I binden konnten (Emody, *et al.*, 1989). Auch pH-Wert-Änderungen auf Werte zwischen 5,0 und 10,0 hatten keinen Einfluss auf die Kollagenbindungsfähigkeit (Skurnik, *et al.*, 1984). Versuche zum Austausch der YadA-Membranankerdomäne durch Membranankerregionen homologer Proteine aus der Oca-Familie wie UspA1, Hia und EibA zeigten trimere Hybridproteine mit erhaltener korrekter Translokation, was die hohe Homologie der TAA-Anker belegt (Ackermann, *et al.*, 2008).

1.5.7 Funktionen von YadA

YadA ist ein multifunktionales Protein dessen Funktionen durch bestimmte YadA-Domänen vermittelt werden. Es zeigte sich, dass YadA für *Y. enterocolitica* einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt, wogegen sich bei *yadA*-defizienten *Y. pseudotuberculosis*-Mutanten keine entscheidende Virulenzminderung im Mausmodell nachweisbar war (Kapperud, *et al.*, 1987). YadA vermittelt bei maximaler Expression (bei 37°C) und in infizierten Geweben interbakterielle Adhärenz (in Flüssigmedien Autoagglutination) (Skurnik, *et al.*, 1984; Tamm, *et al.*, 1993). Eine weitere Eigenschaft von YadA ist die Vermittlung der Bindungsfähigkeit von Kollagen Typ I, II und IV (Emody, *et al.*, 1989; Roggenkamp, *et al.*, 1995a; Schulze-Koops, *et al.*, 1992). In Studien mit verschiedenen *yadA*-Deletionsmutanten ließ sich zeigen, dass Deletionen im YadA-Kopfbereich zu einer geminderten oder aufgehobenen Kollagen-Bindungsfähigkeit führten (Roggenkamp, *et al.*, 1995a; Tamm, *et al.*, 1993). Hierbei wurden die Aminosäuren 26 -241 als Interaktionsdomäne identifiziert, was zeigt, dass die YadA-Kopfdomäne aber auch die YadA-Konnektordomäne (AS 190-221) für die Interaktion mit Kollagen notwendig sind (Roggenkamp, *et al.*, 2003; Tahir, *et al.*, 2000). YadA interagiert neben Kollagen auch mit anderen Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), wie zellulärem Fibronectin und Laminin (Flügel, *et al.*, 1994; Terti, 1992). Allerdings ist die Bindung an diese schwächer als die Kollagen-Bindung (Heise, *et al.*, 2006; Roggenkamp, *et al.*, 2003). Des Weiteren vermittelt die YadA-Kopfdomäne die Bindung und extrazelluläre Lokalisation

an verschiedene epitheliale Zellen wie HeLa-Zellen und Hep-2-Zellen, sowie die Adhäsion an Phagozyten (Bukholm, *et al.*, 1990; Heesemann, 1987; Roggenkamp, *et al.*, 1996). Im Zellkulturmodell konnte gezeigt werden, dass YadA, ebenso wie Invasin, die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 in epithelialen Zellen induzieren kann (Schmid, *et al.*, 2004). YadA von *Y. pseudotuberculosis* (YadA_{pstb}) soll über Fibronektin an β 1-Integrine binden (Brückenmechanismus) und damit eine effektive Aufnahme des Erregers in epitheliale Zellen wie etwa Hep-2-Zellen ermöglichen (Eitel, *et al.*, 2002). Dies wird vermutlich durch eine spezifische N-terminale Aminosäuresequenz vermittelt, die ausschließlich in YadA_{pstb} vorkommt (Heise, *et al.*, 2006). Weiterhin binden Yersinien mittels YadA an humane

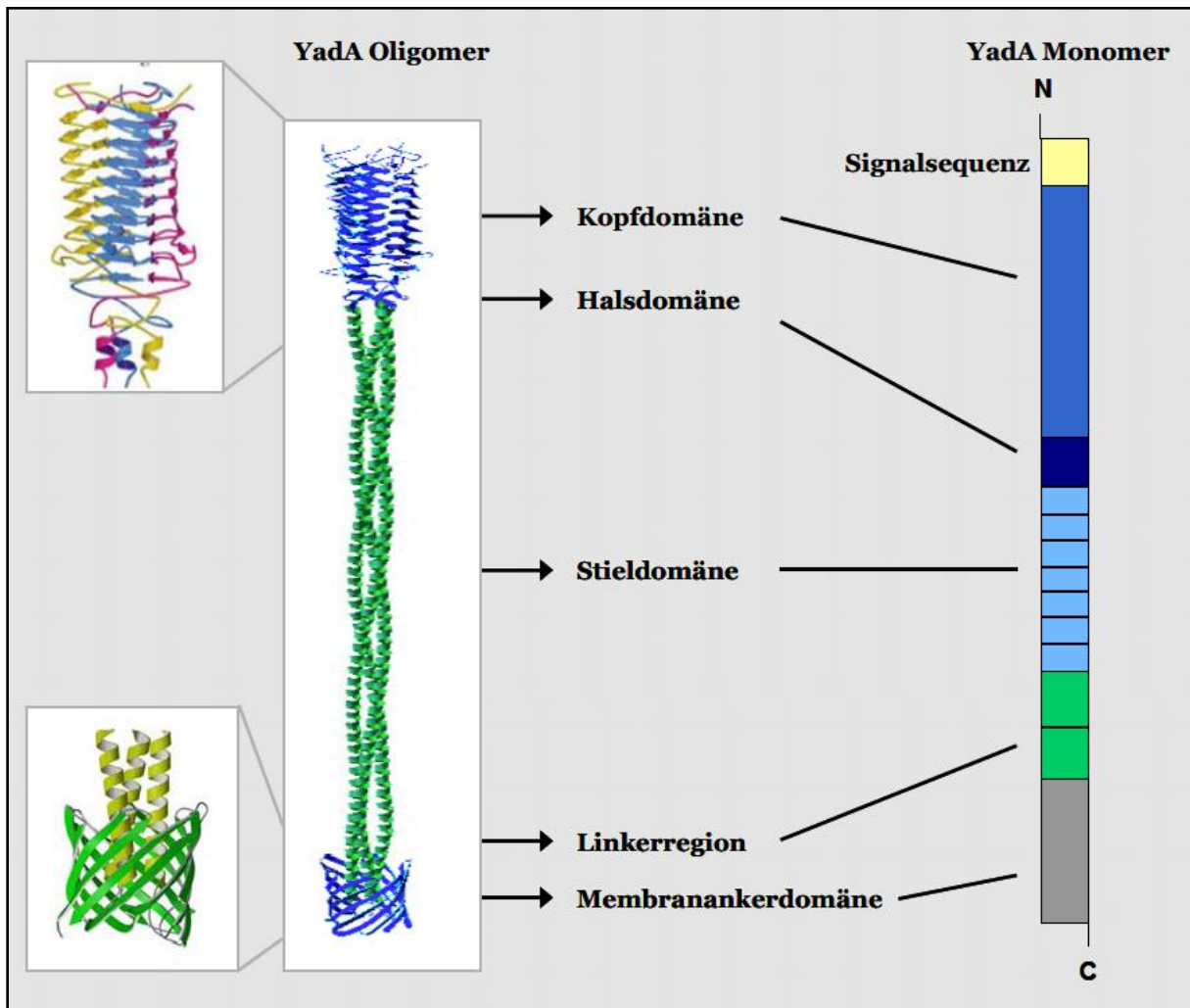


Abb.2: Struktur des *Yersinia* Adhäsins YadA. Links: Modell des YadA Oligomers erstellt mit dem DeepView PDB Programm:

Struktur des Membranankers nach Koretke (2006) und Struktur der Kopfdomäne nach Nummelin (2004). Rechts: lineare Darstellung des YadA-Monomers von *Y. enterocolitica* WA-314. Die N-terminale Signalsequenz, die Kopfdomäne, die Konnektordomäne (Konnektor), die Stieldomäne (aus sieben „15mer repeats“), die linker-Region (aus zwei „7mer repeats“), sowie der C-terminale Membrananker sind dargestellt. (aus Nägele, 2010)

neutrophile Granulozyten (PMN), auch in nicht opsoniertem Zustand (Roggenkamp, *et al.*, 1996). Durch die Wirkung von Yops kommt es zur Inhibition der Granulozytenfunktion und zur Unterdrückung des „oxidative burst“ (Ruckdeschel, *et al.*, 1996). Darüber hinaus soll YadA eine Resistenz gegen Granulozyten-Defensine vermitteln (Visser, *et al.*, 1996). Zudem wurde für YadA auch eine Bindungsfähigkeit an intestinalen Mukus und Bürstensaummembranen von Kaninchen *in vitro* nachgewiesen (Mantle, *et al.*, 1989; Paerregaard, *et al.*, 1991). Im Mausinfektionsmodell konnte die Rolle von YadA als bedeutender Virulenzfaktor aufgezeigt werden (Pepe, *et al.*, 1995). Versuche mit YadA-Mutanten mit fehlender Neutrophilen-Bindefunktion oder Kollagen-Bindeeigenschaft zeigten, dass diese deutlich attenuiert waren (Roggenkamp, *et al.*, 1996; Tamm, *et al.*, 1993). YadA ist zudem für die Persistenz und Proliferation von Yersinien in den Peyerschen Plaques wichtig (Bliska, *et al.*, 1993; Pepe, *et al.*, 1995). Außerdem konnten Mäuse mit YadA-spezifischen Antikörpern passiv gegen eine intravenöse Infektion mit *Y. enterocolitica* immunisiert werden (Vogel, *et al.*, 1993). Eine weitere wichtige Funktion von YadA ist die Vermittlung von Serumresistenz, also der Schutz vor Lyse durch das Komplementsystem des Wirts. Möglicherweise verhindert YadA die Opsonierung der Erreger durch den Komplementfaktor C3b (Balligand, *et al.*, 1985; Pilz, *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die YadA-Membranankerdomäne für das Überleben in humanem Serum entscheidend ist. Während Deletionen in der Kopf- und Konnektor-Region von YadA keinen Einfluss auf die Serumresistenz hatten, zeigten Versuche zum Austausch der YadA-Ankerdomäne durch Membrananker homologer Oca-Proteine, dass nur die Membranankerdomäne von YadA das Überleben von Yersinien in humanem Serum ermöglichte (Ackermann, *et al.*, 2008; Roggenkamp, *et al.*, 2003). Die Aktivierung des klassischen oder alternativen Weges des Komplementsystems wird durch C4BP (C4b-bindendes Protein) und Faktor H reguliert, wobei beide als Cofaktoren fungieren. Faktor H ist an der Faktor I-abhängigen Spaltung von C3b in die inaktive Form iC3b beteiligt (Sim, *et al.*, 1981; Whaley, *et al.*, 1976). C4BP ist Cofaktor bei der Faktor I-abhängigen Spaltung von C4b in C4a und C4c. Zudem induzieren beide den Abbau der C3-Konvertase des alternativen und klassischen Komplementweges (Gigli, *et al.*, 1979). Es konnte gezeigt werden, dass YadA von *Y. enterocolitica* O:3 zusammen mit dem Ail-Protein an C4BP bindet, wodurch die komplementvermittelte Lyse verhindert wird (Biedzka-Sarek, *et al.*, 2008). Außerdem fanden sich im YadA-Stielbereich unterschiedliche Motive für die Faktor H-Bindung, wobei dessen Bindung allein nicht für die Komplementresistenz ausreicht (Biedzka-Sarek, *et al.*, 2008).

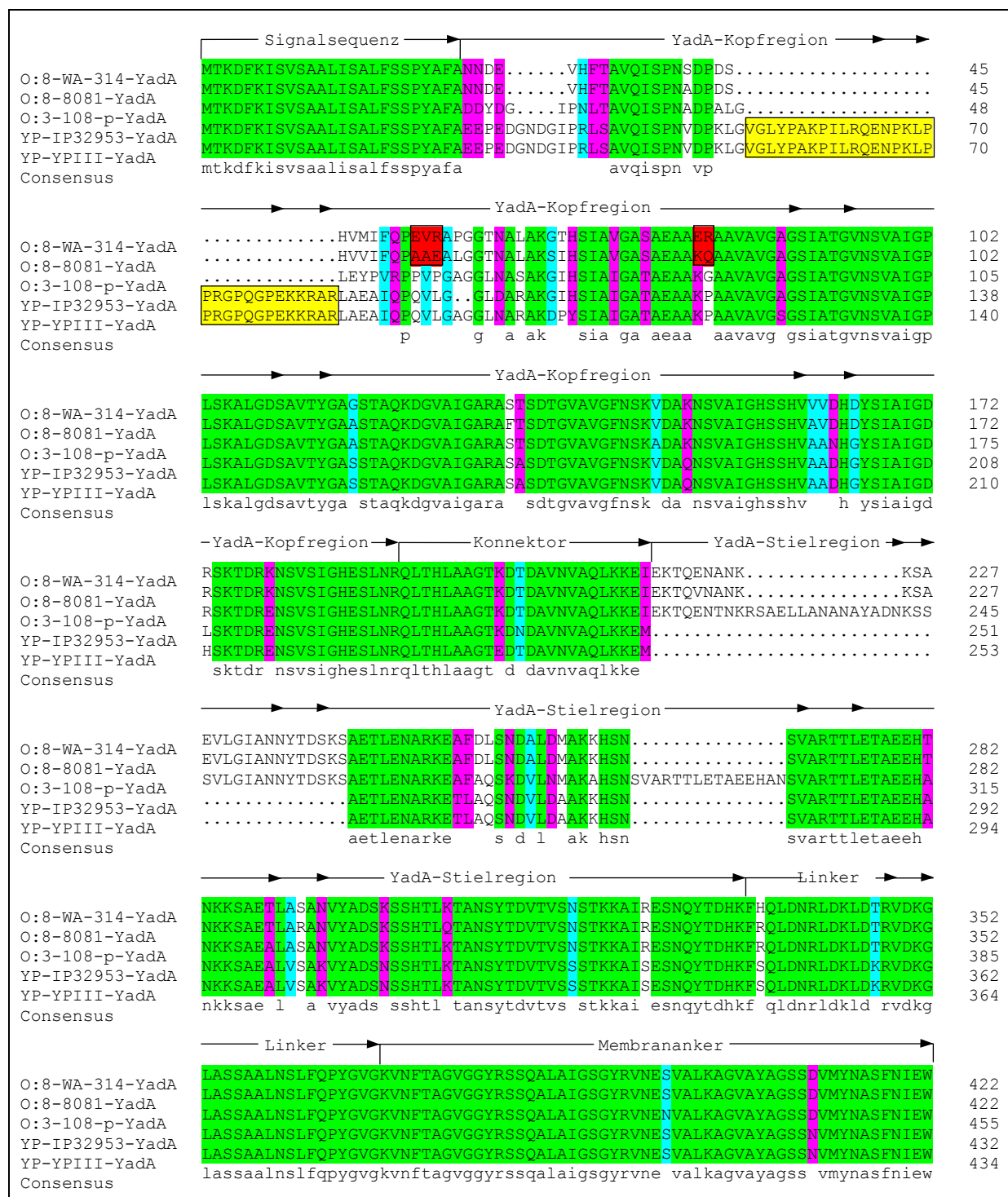


Abb.3: „Multiple Sequence Alignment“ der YadA-Proteine von *Y. enterocolitica* O:8 Stamm WA-314 und Stamm 8081, *Y. enterocolitica* O:3 Stamm 108-p/76 und *Y. pseudotuberculosis* Serotyp I, Stamm IP32953 und Serotyp III, Stamm YPIII (ausgeführt mit ClustalW2):

Dargestellt ist die Gesamtsequenz der 422 – 455 Aminosäuren (AS) und ihre Unterteilung in die Bereiche: Kopf, Konnektor, Stiel, Linker und Membrananker (Hoiczyk, *et al.*, 2000). Deutlich erkennbar ist die hohe Homologie, besonders zwischen den beiden *Y. enterocolitica* O:8-Stämmen. Gelb hervorgehoben ist die von Heise & Dersch beschriebene, ausschließlich in *Y. pseudotuberculosis* enthaltene, 31 AS lange Sequenz (Heise, *et al.*, 2006). Rot hervorgehoben sind die Aminosäurenunterschiede zwischen den beiden *Y. enterocolitica* O:8-Stämmen, die eine unterschiedliche molekulare Ladung hervorrufen. Grün markiert sind vollkonservierte Bereiche; pink markiert sind konservierte AS-Gruppen mit sehr ähnlichen Eigenschaften; türkis markiert sind konservierte AS-Gruppen mit geringfügig ähnlichen Eigenschaften.

1.6 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Yersinien dringen in die Peyerschen Plaques ein und vermehren sich unter Mikrokoloniebildung mit nachfolgender Abszedierung und Dissemination. Bei *Y. pseudotuberculosis* bedeutet dies meist eine mesenteriale Lymphadenitis in Form einer Ausbreitung über die abführenden Lymphbahnen in die mesenterialen Lymphknoten. Bei *Y. enterocolitica* hingegen kommt es zusätzlich zum Befall und zur Schädigung der weiter proximal und distal gelegenen Darmabschnitte, also zur Enterokolitis. Bislang ist nicht geklärt, ob diese Unterschiede den Infektionsverlauf beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass ein kleines Motiv im N-terminalen Bereich der Kopfregion von YadA_{pstb}, welches bei YadA_{ent} fehlt, zu Unterschieden in der Adhärenz an EZM-Proteine, der Invasion in Hep-2-Zellen und im oralen Mausinfektionsmodell führt, wenn es mit einer YadA_{pstb}-Deletionsmutante verglichen wird (Heise, *et al.*, 2006). Die Sequenzanalyse verschiedener YadA_{ent}-Varianten zeigte eine hohe Homologie zu diesen YadA_{pstb}-Deletions-Mutanten, allerdings fanden sich Differenzen in der Aminosäurefolge im N-terminalen Bereich der Kopf-Region, welche zu deutlichen Ladungsänderungen führen und dadurch Unterschiede in Bindungs- und Virulenzeigenschaften bedingen könnten (Abb.3). Zusammengefasst unterscheiden sich die Aminosäuresequenz von *Y. pseudotuberculosis* YadA von *Y. enterocolitica*. Darüber hinaus sind auch innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* die YadA-Sequenzen vom Serotyp abhängig (O:3, O:8, O:9, O:5, O:27).

Die Bindung an Wirtsgewebe stellt einen frühen entscheidenden Schritt in der Pathogenese der meisten bakteriellen Infektionen dar und hat somit oftmals deutlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Dabei weisen neueste Ergebnisse daraufhin, dass kleinste molekulare Unterschiede in ansonsten hoch homologen Adhäsinen große Unterschiede in den Virulenzeigenschaften eines Erregers hervorrufen können. Ein genaueres Verständnis der Bedeutung besagter Unterschiede könnte einen Beitrag dazu leisten, die Pathomechanismen gramnegativer Erreger besser zu verstehen, und neue Therapie- bzw. Präventionsmöglichkeiten im Tiermodell zu entwickeln.

In diesem Kontext erscheint es sinnvoll, den Einfluss von Spezies-, Serotyp- und Stammvariationen in YadA auf den Infektionsverlauf peroral infizierter Mäuse zu untersuchen. Folgende Ziele standen im Vordergrund:

1. Genvarianten von YadA sollten in *Y. enterocolitica* Serotyp O:8, Stamm WA-314 als definiertem Expressionsmodell eingebracht werden. Die vollständigen *yadA*-Gene oder Genhybride sollten in bereits erstellte, geeignete Plasmidvektoren eingebracht und hinsichtlich ihrer Expression, Außenmembraninsertion und Oligomerisierung in *Y. enterocolitica* O:8 verglichen werden.
2. Die Wirkung des Austauschs der bindungsvermittelnden Kopf-Region von YadA_{ent} durch die homologe Kopf-Region von YadA_{pstb} sollten bezüglich neuer Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau dieser Proteinfamilie untersucht werden.
3. Die erstellten Konstrukte sollten auf funktionelle Unterschiede im Bindungsverhalten an Komponenten der extrazellulären Matrix, sowie hinsichtlich ihres Adhärenz- und Invasionsverhaltens an HeLa-Zellen untersucht werden. Entsprechend wurde zudem die Virulenz der Konstrukte im oralen Mausinfektionsmodell verglichen und die Ausbreitungsform in bestimmten Wirtsorganen mittels histochemischer und immunhistochemischer Gewebsuntersuchung analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material:

2.1.1 Geräte

Geräte	Bezeichnung	Firma
Analysenwage	440-35N	Kern & Sohn (Balingen-Frommern, Deutschland)
Blot-Apparatur	Mini-Trans-Blot	Bio-Rad (München, Deutschland)
Brutschrank	Typ B-20	Hereaus (Hanau, Deutschland)
Elektrophoresekammer für PAGE	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (München)
Elektroporator	MicroPulser™	Bio-Rad (München)
Filmentwickler	Fujifilm FPM-100A	Fuji (Düsseldorf, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	Mini-SUB ^R Cell GT	Bio-Rad (München)
Geldokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
Homogenisator	MM 2000	Retsch (Wuppertal, Deutschland)
Kryostat	Leica CM 1950	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Mikroskope:		
Lichtmikroskop	Axivert 25	Zeiss (Jena, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Bx61	Olympus (Tokyo, Japan)
Mikrotiterplattenphotometer	Sunrise Tecan, Magellan3 Software	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved 0,1mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
PCR-Cycler	Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter	DIGITAL-pH-Meter	Bachofer (Reutlingen, Deutschland)
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
Schüttelinkubator	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sterilwerkbank	Laminar Air HBB2436	Heraeus (Hanau)
Thermoblock	Eppendorf 5320 Thermostat	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschall-Applikator	Sonifier 250	Branson (Danbury, USA)
Whirlmix	Vortex Genie	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Zentrifugen:		
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Standardzentrifuge	Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Cytospin	Cytospin 3	Life-science international (Frankfurt, Deutschland)

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Zusätzlich zu den aufgeführten Geräten wurden Standardlaborgeräte verwendet.

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie/Biochemikalie	Firma
1 kb Plus DNS-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
10 x PCR-Puffer	Perkin-Elmer (Rodgau, Deutschland)
Aceton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid-N	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Agar	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Peglab (Erlangen, Deutschland)
Amidoschwarz	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Antibiotika-Plättchen (Amp, Cm, Gen, Kana, Spec)	Oxoid (Basingstoke, UK)
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva (Heidelberg)
BCIP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BHI	BD Bioscience (Heidelberg)
Bisacrylamid	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Blutagarplatten	Oxoid (Basingstoke)
Bradford Reagent	BioRad (München)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BSA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
CIN-Agar-Platten	Oxoid (Basingstoke)
Citronensäure	Merck (Darmstadt)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Coomassie Brilliant Blue™ R250	Merck (Darmstadt)
DAPI	Invitrogen (Karlsruhe)
Diethanolamin	Merck (Darmstadt)
DMF	Merck (Darmstadt)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
dNTP Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
ECL Western Blotting Reagenz	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
EGTA	Roth (Karlsruhe)
Eosin Y	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
F-12	Invitrogen (Karlsruhe)
FCS	Invitrogen (Karlsruhe)
Fibronektin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Folin-Ciocalteu's Reagenz	Fluka (Neu-Ulm)
Fuji Medical X-Ray Film Super Rx	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Gentamicin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Glucose	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glyceringelatine	Merck (Darmstadt)
Glycin	MP Biomedicals (Solon, USA)
Hämalaun (Mayers Hämalaun)	Merck (Darmstadt)
Hefe-Extrakt	MP Biomedicals (Solon)
Immersionsöl	Zeiss (Jena)

Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumnatriumtartrat	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kollagen Typ I	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kupfer-II-Sulfat-Pentahydrat	Merck (Darmstadt)
L-Arabinose	Fluka (Neu-Ulm)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid	Fermentas (St. Leon-Rot)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Millex-HV Filter 0,45 μ m	Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland)
Mowiol 488	Roth (Karlsruhe)
Müller-Hinton-Agar-Platten	Roth (Karlsruhe)
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
NBT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Natronlauge (NaOH)	Merck (Darmstadt)
o-Phenylendiamin	Dako (Glostrup, Dänemark)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Proteinstandard „BenchMark“	Invitrogen (Karlsruhe)
Protan BA Nitrozellulose Transfer Membran	Schleicher und Schüll (Dassel, Deutschland)
Restriktionsenzyme & zugehörige Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
RPMI 1640	Invitrogen (Karlsruhe)
Rubidiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (HCL)	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure	Merck (Darmstadt)
SDS	Serva (Heidelberg)
Spectinomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Sucrose (Saccharose)	Merck (Darmstadt)
T4 DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-Polymerase	Perkin-Elmer (Rodgau)
TEMED (N,N,N',N' – Tetramethylethylendiamin)	Biomol (Hamburg)
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek (Torrance, USA)
Trishydroxymethylaminomethan	Merck (Darmstadt)
Triton-x-100	Merck (Darmstadt)
Trypton	Oxoid (Basingstoke)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Merck (Darmstadt)

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

2.1.3 Nährmedien

Alle folgenden Nährmedien wurden mit H₂O_{dest} angesetzt und für 20 min bei 121 °C und einem Überdruck von 1 bar autoklaviert.

Bakteriennährmedien:

Luria-Bertani (LB)-Medium:	10 g/l	Trypton, pH 7,4 - 7,5
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
LB-Agar:	15 g Agar / 1000 ml LB-Medium	
LB-Einfriermedium:	LB-Medium mit 20 % Glycerin	
Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium:	37 g/l	
SOC-Medium:	20 g/l	Trypton, pH 7,0
	5 g/l	Hefeextrakt
	0,5 g/l	NaCl
	250 mM	KCl
	20 mM	Glukose (sterilfiltriert)
YT-Medium:	2,0%	Trypton, pH 7,6
	0,5%	Hefeextrakt
	0,4%	MgSO ₄
	10mM	KCl

Zellkulturmedien:

F-12:	Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI:	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.4 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Lösungsmittel
Verwendung zur Kultivierung von <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> und <i>E. coli</i> :			
Ampicillin	10 mg/ml	100 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Kanamycin	5 mg/ml	50 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Spectinomycin	5 mg/ml	50 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Chloramphenicol	2 mg/ml	20 µg/ml	70% Ethanol
Nalidixinsäure	6 mg/ml	60 µg/ml	0,5M NaOH

Verwendung bei Infektionsversuchen:

Gentamicin	10 mg/ml	50 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
------------	----------	----------	-----------------------------------

2.1.5 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

2.1.5.1 Bakterienstämme

Yersinia enterocolitica-Stämme:

Stamm	Beschreibung	Referenz
WA (pYV)	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8; Stamm WA-314, Träger des Virulenzplasmids pYVO8	Heesemann et al., 1983
WA-C	pYV-freies Derivat von WA-314	Heesemann et al., 1983
WA-C Δ inv	Invasingen-ko Mutante von WA-C	Ruckdeschel et al., 1996
8081	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8, Stamm 8081, Träger des Virulenzplasmids pYV8081	Portnoy et al., 1981
108-p	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:3, Stamm 108-p, Träger des Virulenzplasmids pYVO3	Heesemann et al., 1984

Tabelle 5: Verwendete *Yersinia enterocolitica*-Stämme

Yersinia pseudotuberculosis-Stämme:

Stamm	Beschreibung	Referenz
IP32953	<i>Y. pseudotuberculosis</i> Serotyp O:1b, Stamm IP32953, Träger des Virulenzplasmids pYVypI	Chain et al., 2004
YPIII	<i>Y. pseudotuberculosis</i> Serotyp III, Stamm YPIII, Träger des Virulenzplasmids pYVypIII	Bölin et al., 1982
IP-C	pYVypI-freies Derivat von IP32953	diese Arbeit
YPIII-C	pYVypIII-freies Derivat von YPIII	diese Arbeit

Tabelle 6: Verwendete *Yersinia pseudotuberculosis*-Stämme

Escherichia coli-Stämme:

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 α	<i>E. coli</i> endA1 supE44 hsdR17($r_k^- m_k^+$) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ (lacZYA-argF) U169 (ϕ 80lacZ Δ M15)	Hanahan, 1983
SM10 λ pir	thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-TC::Mu-Kan (λ pir), Km ^r	Miller und Mekalanos, 1988

Tabelle 7: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

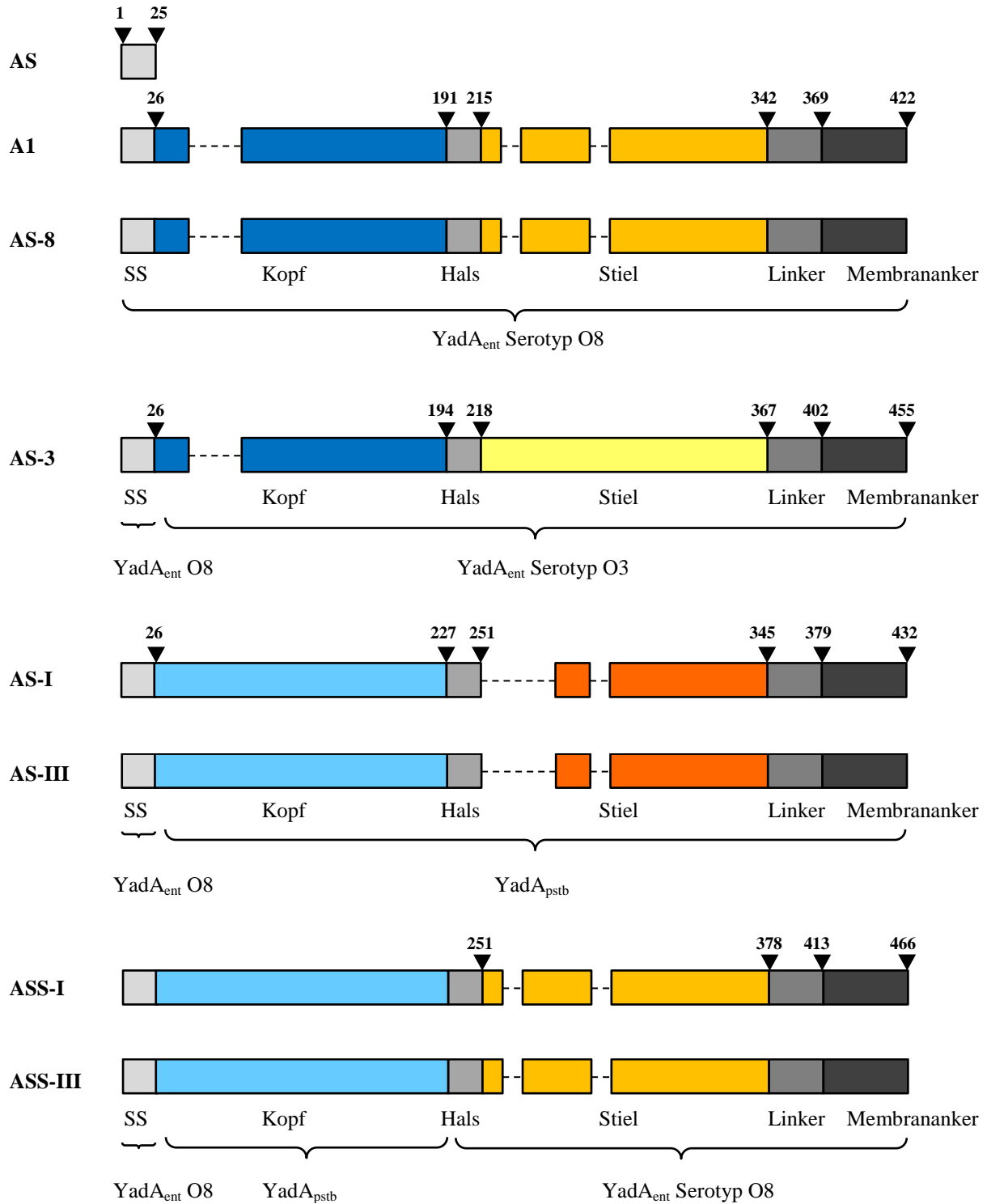


Abb.4: Schematische Darstellung der YadA-Hybride in *Y. enterocolitica*

Die Pfeile geben die Aminosäureposition der YadA-Domänen an. *Y. enterocolitica* YadA-Varianten unterscheiden sich durch die Länge des „Stiels“. *Y. pseudotuberculosis* YadA-Varianten haben eine voluminösere Kopfstruktur als die von *Y. enterocolitica*. Für alle Hybride sind Signalsequenz (SS), Kopf-, Hals-, Stiel-, Linker- und Membranankerdomäne dargestellt. Alle Hybride tragen die SS von *Y. enterocolitica* Serotyp O8. SS, Halsdomäne (Konnektor), Linker und Membrananker stellen hochkonservierte Bereiche dar, die sich nur marginal unterscheiden. Die YadA_{ent}-YadA_{pstb}-Hybride tragen eine Kopfdomäne von *Y. pseudotuberculosis* und die Stieldomäne von *Y. enterocolitica* WA-314, diese sind über die Halsdomäne verbunden.

2.1.5.2 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pYVO8	WA-314/WA(pYVO8)	Heesemann et al., 1983
pYV8081	8081/8081(pYV8081)	Portnoy et al., 1981
pYVO3	Y-108P/108(pYVO3)	Heesemann et al., 1984
pYV-I	IP32953/YP(pYV-I)	Chain et al., 2004
pYV-III	YPIII (pIB1)/YP(pYV-III)	Bölin et al., 1982
pUC-A-1	pUC13 mit 5kb EcoRI/HindIII Fragment von pYVO8, <i>yadA</i> -positiv	Roggenkamp et al., 1995
pUC:SS	pUC-A-1 mit <i>yadA</i> bp1-87	Nägele, 2010
pGP:SS	pGP704 mit EcoRI/SphI Fragment von pUC:SS	Nägele, 2010
pHP45Ω	Ursprung der Spectinomycin (Spc) Kasette	Prentki und Kirsch, 1984
pGPS-A-H	pGP704, 1,8 kb Spc-Kasette in der EcoRI site, besitzt <i>yadA</i> als ein EcoRI/SphI Fragment von pUC-A-H (Deletion der bp 88-565)	Ackermann, 2005
pGPS-A-1	pGP704, 1,8 kb Spc-Kasette in der EcoRI site, besitzt <i>yadA</i> als ein EcoRI/SphI Fragment von pUC-A-1	Roggenkamp <i>et al</i> , 1995
pGPS:S	1,8 kb Spc-Kasette in der EcoRI site von pGPS:	Nägele, 2010
pGPS-8081	pGP704, 1,8 kb Spc-Kasette in der EcoRI site, besitzt <i>yadA</i> als ein EcoRI/SphI Fragment von pYV8081	Max-von-Pettenkofer-Institut
pGPS-108-p	pGP704, 1,8 kb Spc-Kasette inseriert in die EcoRI site, besitzt <i>yadA</i> als ein EcoRI/SphI Fragment von pYVO3	Max-von-Pettenkofer-Institut
pGPS-IP32953	pGP704, 1,8 kb Spc-Kasette inseriert in die EcoRI site, besitzt <i>yadA</i> als ein EcoRI/SphI Fragment von pYV-I	Max-von-Pettenkofer-Institut
pGPS-IP32953H	pGPS-A-H, besitzt die <i>yadA</i> -Kopfdomäne von pYV-I als SacI/SacI-Fragment	Max-von-Pettenkofer-Institut
pGPS-YPIII	pGP704, 1,8 kb Spc-Kasette inseriert in die EcoRI site, besitzt <i>yadA</i> als ein EcoRI/SphI Fragment von pYV-III	Max-von-Pettenkofer-Institut
pGPS-YPIIIH	pGPS-A-H, besitzt die <i>yadA</i> -Kopfdomäne von pYV-III als SacI/SacI-Fragment	Max-von-Pettenkofer-Institut
pYV-A0	pYVO8 mit Deletion des <i>yadA</i> -Gens	Roggenkamp et al., 1995
pYV-AS	pYVO8 mit deletierter <i>yadA</i> -Gensequenz für das prozessierte YadA, d.h. <i>yadA</i> -Promotorregion und Sequenz für YadA Signalsequenz (AS) sind noch vorhanden	Nägele, 2010

pYV-ASS	pYVO8 mit deletierter Sequenz für die YadA-Kopfregeion, d.h. es wird „kopfloes“ YadA in die äußere Membran inseriert (YadA-Stiel)	
pYV-A1	pYV-A0 mit <i>yadA</i> -Insertion durch allelen Austausch	Roggenkamp et al., 1995
pYV-AS-8	pYV-AS mit fusionierter Gensequenz für das reife YadA, kodiert auf pYV8081	Max-von-Pettenkofer-Institut
pYV-AS-3	pYV-AS mit fusionierter Gensequenz für das reife YadA, kodiert auf pYVO3	Max-von-Pettenkofer-Institut
pYV-AS-I	pYV-AS mit fusionierter Gensequenz für das reife YadA, kodiert auf pYV-I	Max-von-Pettenkofer-Institut
pYV-ASS-I	pYV-ASS mit fusionierter Gensequenz für die „Kopfregeion“ von YadA, kodiert auf pYV-I	Max-von-Pettenkofer-Institut
pYV-AS-III	pYV-AS mit fusionierter Gensequenz für das reife YadA, kodiert auf pYV-III	Max-von-Pettenkofer-Institut
pYV-ASS-III	pYV-ASS mit fusionierter Gensequenz für die „Kopfregeion“ von YadA, kodiert auf pYV-III	Max-von-Pettenkofer-Institut
pACYC177	Klonierungsvektor, Ap ^R , Tc ^R , Ursprung der Kanamycin-(Km)-Kassette	Chang und Cohen, 1978
pKD46	Trägt das Gen für <i>red-α</i> , <i>-β</i> , <i>-γ</i>	Datsenko und Wanner, 2000
pYV32953::kanΔ <i>yadA</i>	IP32953, <i>yadA</i> ⁻ , Km-Gen-Block inseriert mittels homologer Bereiche im Rahmenbereich des <i>yadA</i> -Gens durch Austausch von Allelen	diese Arbeit
pIB1::kanΔ <i>yadA</i>	YPIII, <i>yadA</i> ⁻ , Km-Gen-Block inseriert mittels homologer Bereiche im Rahmenbereich des <i>yadA</i> -Gens durch Austausch von Allelen	diese Arbeit
pACYC184	Klonierungsvektor, Tc ^R , Cm ^R	Chang und Cohen, 1978
pAC-F	pACYC184 mit inseriertem <i>virF</i> -Gen (Transkriptionsaktivator für YadA und <i>yop</i> Gene) als SalI/SphI-Fragment	Nägele, 2010
pAC-F-A1	pAC-F mit <i>yadA</i> -Gen aus pYVO8 als XbaI/BamHI-Fragment	Nägele, 2010
pAC-F-AS-8	Austausch der <i>yadA</i> -Gensequenz in pAC-F-A1 für das „reife“ YadA durch die entsprechende <i>yadA</i> -Gensequenz aus pYV8081: Fusion der YadA Promotorregion und der Sequenz für die Signalsequenz aus pAC-F-A1 : YadA08	diese Arbeit

pAC-F-AS-3	Austausch der <i>yadA</i> -Gensequenz in pAC-F-A1 für das „reife“ YadA durch die entsprechende <i>yadA</i> -Gensequenz aus pYVO3: Fusion der YadA Promotorregion und der Sequenz für die Signalsequenz aus pAC-F-A1 : YadA03	diese Arbeit
pAC-F-AS-I	Austausch der <i>yadA</i> -Gensequenz in pAC-F-A1 für das „reife“ YadA durch die entsprechende <i>yadA</i> -Gensequenz aus pYV-I: Fusion der YadA Promotorregion und der Sequenz für die Signalsequenz aus pAC-F-A1 : YadA-I	diese Arbeit
pAC-F-ASS-I	Austausch der <i>yadA</i> -Gensequenz in pAC-F-A1 für die Kopfregion des YadA durch die entsprechende <i>yadA</i> -Gensequenz der Kopfregion aus pYV-I: YadA-Hybrid-I	diese Arbeit
pAC-F-AS-III	Austausch der <i>yadA</i> -Gensequenz in pAC-F-A1 für das „reife“ YadA durch die entsprechende <i>yadA</i> -Gensequenz aus pYV-III: Fusion der YadA Promotorregion und der Sequenz für die Signalsequenz aus pAC-F-A1 : YadA-III	diese Arbeit
pAC-F-ASS-III	Austausch der <i>yadA</i> -Gensequenz in pAC-F-A1 für die Kopfregion des YadA durch die entsprechende <i>yadA</i> -Gensequenz der Kopfregion aus pYV-III: YadA-Hybrid-III	diese Arbeit

Tabelle 8: Verwendete Plasmide

H: Kopf (Head)-Region von YadA; S: YadA-Promotorregion und –Signalsequenzcodons; Ap^R: Ampicillinresistenz; Tc^R: Tetracyclinresistenz; Cm^R: Chloramphenicolresistenz

2.1.6 Verwendete Primer/Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) in lyophilisiertem und entsalztem Zustand erhalten, in H₂O_{bidest.} gelöst, und in Konzentrationen von 100 pmol/μl bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _M [°C]	Verwendung
A-1-f	ATG ACT AAA GAT TTT AAG ATC AGT	55,0	Sequenzierung von pYVO8 und pACYC184 Plasmiden mit integriertem <i>yadA</i>

A-1269-r	TTA CCA CTC GAT ATT AAA TGC	51,0	Überprüfung der Lokalisation von <i>yadA</i> , Start bp 1269 des <i>yadA</i>
A-144f-XbaI	TTA <u>ATC TAG</u> ATA GTG CTG TTT TTT GCA TG	63,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> aus pGPS Plasmiden, Start 144 bp vor <i>yadA</i> (= Promotor); Einführung einer XbaI Schnittstelle
A-119r-BamHI	AAT TGG ATC CAA CTG AAA CCA TGA TAA AAA GC	67,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> aus pGPS Plasmiden, Start 119 bp nach <i>yadA</i> (= Terminator); Einführung einer BamHI Schnittstelle
pACYC177-Kana_IP-315_DW-f	AAG GGT ATC <u>CAT AGC ATT</u> <u>GCG ATT GGT GCT ACT GCT</u> <u>GAA GCA GCG AAA CCT</u> CAC TGA CAC CCT CAT CAG TG	64,0	Amplifizierung der Kanamycin-Kassette aus pACYC177 mit Homologieregion (pink) zu <i>yadA</i> -Gen (bpp 315-356) von IP32953 bzw. YPIII
pACYC177-Kana_IP-1159_DW-r	ATG ACA TTA <u>GAA CCA ATT</u> <u>GCT AAT GCC TGA CTA GAA</u> <u>CGA TAT CCC CCG ACC</u> GTC AAG TCA GCG TAA TGC TC	64,0	Amplifizierung der Kanamycin-Kassette aus pACYC177 mit Homologieregion (pink) zu <i>yadA</i> -Gen (bpp1159-1200) von IP32953 bzw. YPIII
pACYC177-Kana_Test-f	TCA CTG ACA CCC TCA TCA GTG	64,0	Überprüfung auf erfolgreichen rekombinanten <i>yadA</i> -Knockout durch Kanamycin-Kassette
pACYC177-Kana_Test-r	CGT CAA GTC AGC GTA ATG CTC	64,0	Überprüfung auf erfolgreichen rekombinanten <i>yadA</i> -Knockout durch Kanamycin-Kassette
pKD46_1662-f	ACG AAT GAG TAC TGC ACT CG	60,0	Screening auf pKD46, Start bei bp 1662 (4 bp vor <i>bet</i>)
pKD46_2433-r	TCA TGC TGC CAC CTT CTG C	60,0	Screening auf pKD46, Start bei bp 2433 (19 bp nach <i>bet</i>)
A8081-6-OE-f	TGA CGA GGT TCA TTT TAC AGC	60,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> aus pGPS-8081, mit Austausch einer Base zur Deletion einer Schnittstelle, unter Beibehalt der AS-Sequenz
A8081-26-OE-r	GCT GTA AAA TGA ACC TCG TCA	60,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> aus pGPS-8081, mit Austausch einer Base zur Deletion einer Schnittstelle, unter Beibehalt der AS-Sequenz
Virf-151f-SphI	AAT <u>AGC ATG CTT</u> GCC AGT CAC CTA ATA CC	69,0	Amplifizierung von <i>virF</i> aus pYV-A1, Start 151 bp vor <i>virF</i> (= Promotor); Einführung einer SphI Schnittstelle
Virf-86r-SalI	AAT <u>AGT CGA CTT</u> GGC TCA TCC CAT TGA ATC	69,0	Amplifizierung von <i>virF</i> aus pYV-A1, Start 86 bp nach <i>virF</i> (= Terminator); Einführung einer SalI Schnittstelle
A-Cla-f	TTT TAA <u>GAT CGA</u> TTAGT GCT GT	60,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> aus pYVO8 Plasmiden; Start 167 bp vor <i>yadA</i> , Einführung eine ClaI Schnittstelle
A-SphI-r	GTC AAT ACA GAG ATA GAA CAG CT	64,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> aus pYVO8 Plasmiden; Start 569 bp nach <i>yadA</i> , 30 bp nach SphI Schnittstelle

Tabelle 9: Verwendete Primer

2.1.7 Verwendete Antikörper

Bezeichnung (Erläuterung)	eingesetzte Verdünnung	Quelle/Firma
<i>Unkonjugierte Primärantikörper</i>		
Mak 8D1 (monoklonal) Maus anti-YadA; Epitop: YadA-Stiel-domäne AS 290-330 aller Y. enterocolitica YadA	1:1000 (WB), 1:500 (IFA)	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
WAVital (polyklonal) Kaninchen anti-WA-C (Immunisierungs- Antigen: WA-C (pYV))	1:5000 (IF, IFA, Agl), 1:5000 (ELISA)	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
P1:O8 (polyklonal) Kaninchen anti-YadA; Epitop: in der YadA- Neck-Domäne von WA-314 (AS 190-228)	1:1000 (WB), 1:300 (Agl)	Ackermann, 2005
P1-I (polyklonal) Kaninchen anti-YadA;	1:1000 (WB), 1:300 (Agl)	Max von Pettenkofer- Institut
Armenischer Hamster anti-CD11c	1:50 (IF)	BD Bioscience (Heidelberg)
Ratte anti-B220 (B-Zellen)	1:50 (IF)	BD Bioscience (Heidelberg)
Ratte anti-Ly6G (PMN, Granulozyten)	1:50 (IF)	BD Bioscience (Heidelberg)
<i>Enzymkonjugierte Sekundärantikörper</i>		
Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat	1:2000 (WB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ziege anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat	1:2000 (WB, ELISA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Fluorochromkonjugierte Antikörper</i>		
Ziege anti-Kaninchen IgG FITC Konjugat	1:128 (IF)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Fluorochromkonjugierte Sekundärantikörper</i>		
AF555/Cy3 anti-Ratte	1:2000 (IF)	Dianova (Hamburg)
FITC anti-Kaninchen	1:2000 (IF)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FITC anti-armenischer Hamster	1:2000 (IF)	Dianova (Hamburg)
FITC anti-Maus	1:300 (IFA)	Dianova (Hamburg)

Tabelle 10: Liste der verwendeten Antikörper und ihre eingesetzte Verdünnung bzw. Konzentration

WB: Westernblot-Anwendung; IF: Immunfluoreszenz-Anwendung; IFA: Immunfluoreszenz-Assay;
Agl: Antikörper-Agglutinations-Test; FITC: Fluorescein-Isothiocyanat

2.1.8 Enzyme

In Tabelle 11 sind die kommerziell erworbenen Enzyme, die für molekularbiologische Arbeiten verwendet wurden, aufgelistet.

Enzym	Funktion	Firma
Lysozym	Peptidoglykan-Abbau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
RNase	RNS-Abbau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
T4-Ligase	Ligation von Restriktionsenden	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-Polymerase	DNS-Amplifizierung	Perkin Elmer
BamHI	Restriktionsenzym	Fermentas (St. Leon-Rot)

DpnI	Restriktionsenzym	Fermentas (St. Leon-Rot)
EcoRI	Restriktionsenzym	Fermentas (St. Leon-Rot)
SphI	Restriktionsenzym	Fermentas (St. Leon-Rot)
XbaI	Restriktionsenzym	Fermentas (St. Leon-Rot)

Tabelle 11: Verwendete Enzyme

2.1.9 Proteine

In Tabelle 12 sind die kommerziell erworbenen Proteine, die für den ELISA verwendet wurden, aufgelistet.

Protein/Peptid	Konzentration	Quelle
Kollagen Typ I	1 mg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Fibronectin (von humanem Plasma)	1 mg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Tabelle 12: Verwendete Proteine

2.1.10 Zellkultur

2.1.10.1 Eukaryotische Zellen

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit HeLa-Zellen gearbeitet. Die HeLa-Zellen sind die erste menschliche Zelllinie, die als permanente Zelllinie etabliert wurde. Bei diesen Zellen handelt es sich um Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom, die in den 50er Jahren einer Patientin als Biopsat zu Kontrollzwecken entnommen wurden (Scherer, *et al.*, 1953).

2.1.10.2 Zellkulturmedien

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturmedium (RPMI, 10 % FKS) kultiviert, dieses enthält ein isotones, gepuffertes Grundmedium mit anorganischen Salzen, Nährstoffen und Aminosäuren.

Zellkulturmedium: RPMI-Medium
 10 % FKS

Zell-Einfriermedium: 70 % RPMI-Medium
 20 % FKS
 10 % DMSO

2.1.11 Molekularbiologische Kits

Für die Isolierung von Plasmid-DNS, Aufreinigung von PCR-Produkten, Extraktion von DNS aus Agarosegelen, sowie zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden folgende molekularbiologische Kits und Lösungen verwendet.

QIAGEN Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Plasmid DNA Purification Nucleo Bond PC100	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
PCR Clean up, Gel-Extraction Kit Nucleo Spin Extract II	Machery-Nagel, Düren

2.1.12 Software

Zur Bearbeitung und Auswertung der Sequenzen wurden die Programme EditSeq, SeqMan und MegAlign (DNA Star Inc., Madison, USA) verwendet, sowie die Webseite ClustalW2 (Larkin, *et al.*, 2007).

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Soweit nicht anders beschrieben werden die Bakterien in LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum über Nacht bzw. über 12 Stunden im Schüttelinkubator unter aeroben Bedingungen angezüchtet, *Yersinia* bei 27 °C, *E. coli* bei 37 °C, der Temperatur des jeweiligen Wachstumsoptimums. Um das *Yersinia* Adhäsion A zu exprimieren, werden Vorkulturen über Nacht bei 27 °C in LB angezüchtet und am nächsten Morgen 1:40 in RPMI-Medium überimpft, ebenfalls mit Selektionsantibiotikum. Diese Hauptkulturen werden entsprechend den Versuchsanforderungen 2 bis 12 Stunden bzw. bis zum Erreichen einer geforderten OD bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, da YadA bei dieser Temperatur optimal exprimiert wird.

Sollen Stämme aus der bestehenden Stammsammlung, welche bei –80 °C gelagert wird, verwendet werden, so werden von diesen eine geringe Menge auf eine Blutagarplatte geimpft und ein Antibiotikum-Plättchen mit dem notwendigen Selektionsantibiotikum aufgelegt.

Yersinien werden anschließend für zwei Tage bei 27 °C im Brutschrank inkubiert, *E. coli* bei 37 °C für einen Tag.

2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Als kompetente Bakterien bezeichnet man Bakterien, die entweder von Natur aus oder durch eine spezielle vorhergehende Behandlung vermehrt genetisches Material aufnehmen können. In dieser Arbeit wurden hierfür zwei verschiedene Methoden verwendet, die Herstellung Ca^{2+} -kompetenter Bakterien und die Herstellung elektrokompenter Bakterien. Es wurden folgende Stämme mit einer dieser Methoden behandelt: DH5 α (*E. coli*), WA-C (*Y. enterocolitica*), YPIII-C (*Y. pseudotuberculosis*), IP-C (*Y. pseudotuberculosis*). Hierbei wurden die Yersinien elektrokompent gemacht, die *E. coli* Ca^{2+} -kompetent, da sich in der Praxis gezeigt hat, dass so jeweils die Erfolgsraten einer Transformation höher waren.

2.2.2.1 Herstellung Ca^{2+} -kompetenter Bakterien (nach Hanahan)

Für die Herstellung Ca^{2+} -kompetenter Bakterien wird eine Vorkultur in YT-Medium bei 37 °C über Nacht angesetzt. Diese wird mit einer Einzelkolonie beimpft, welche frisch auf Mangelmedium (Müller-Hinton) gewachsen war. Hiermit wird im Verhältnis 1:100 eine Hauptkultur in angewärmtem YT-Medium angeimpft und bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 250 rpm ca. 2-2,5 Stunden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,4-0,5 inkubiert. Die Hauptkultur wird in sterile, zuvor gekühlte 50 ml Falcon-Behälter (BD Bioscience, Heidelberg) verteilt und etwa 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wird sie für 10 min bei 4 °C (vorgekühlter Rotor) und 4000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien werden sehr sorgfältig auf Eis in 30 ml eiskaltem TFB1 pro 100 ml Ausgangskultur resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wird die Suspension wieder für 10 min bei 4 °C und 4000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4 ml eiskaltem TFB2 pro 100 ml Ausgangskultur vorsichtig resuspendiert. Hiervon werden je 400 μl in vorgekühlte Eppendorfhütchen gefüllt und sofort in Trockeneis schockgefroren. Die so behandelten Bakterien werden bei -80 °C gelagert und halten ihre Kompetenz für etwa ein halbes Jahr. In dieser Zeit können sie für eine Transformation verwendet werden (Hanahan, 1983).

TFB1-Puffer	Kaliumacetat, pH 5,8	30 mM
	MnCl ₂	50 mM
	RbCl	100 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin	15 %
TFB2-Puffer	NaMops, pH 7,0	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerin	15 %

2.2.2.2 Transformation Ca²⁺-kompetenter Bakterien

Hierfür werden die Ca²⁺-kompetenten Bakterien 20 min auf Eis aufgetaut. Zu 150 µl der Bakteriensuspension werden 10 µl eines vorangegangenen Ligationsansatzes oder ca. 5 ng Plasmid-DNS zugegeben und dies zusammen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für 90 sec auf 42°C erwärmt und dann für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Folgend gibt man 1 ml auf 37 °C-vorgewärmtes SOC-Medium zu und inkubiert den Ansatz für eine Stunde bei 37 °C und 650 rpm im Schüttelinkubator. Während dieser Zeit sollen die Bakterien sich erholen und ihre chromosomal- und plasmidvermittelten Antibiotikaresistenzfaktoren produzieren. Anschließend werden je Ansatz 100 µl, 200 µl und 400 µl auf vorbereiteten Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 2-3 Tagen können die Platten auf Wachstum von Kolonien kontrolliert werden.

2.2.2.3 Herstellung elektrokompeter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompeter Bakterien wird eine Vorkultur in LB-Medium bei 27 °C über Nacht angesetzt. Diese wird mit einer Einzelkolonie beimpft, welche frisch auf Selektionsmedium (CIN-Agar) gewachsen ist. Hiermit wird ein Liter LB-Medium als Hauptkultur im Verhältnis 1:50 beimpft. Diese wird bei 27 °C und einer Schüttelfrequenz von 250 rpm für etwa sechs Stunden bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-1 inkubiert. Der Behälter wird anschließend für 15-30 min auf Eis gekühlt. Die Hauptkultur wird in vorgekühlte 50 ml-Falcon-Behälter überführt und für 15 min bei 4 °C (vorgekühlter Rotor) und bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in einem Liter eiskaltem Aqua_{bidest} pro 1 l Ausgangskultur aufgenommen. Die Suspension wird für 15 min

bei 4 °C und bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500 ml eiskaltem Aqua_{bidest} pro 1 l Ausgangskultur aufgenommen. Die Suspension wird für 15 min bei 4 °C und bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 20 ml eiskaltem Aqua_{bidest} mit 10 % Glycerol pro 1 l Ausgangskultur aufgenommen. Die Suspension wird ebenfalls für 15 min bei 4 °C und bei 4000 x g zentrifugiert. Das Pellet wird in ein Endvolumen von 2-3 ml eiskaltem Aqua_{bidest} mit 10 % Glycerol pro 1 l Ausgangskultur aufgenommen. Hiervon werden je 40 µl in vorgekühlte Eppendorfhütchen gefüllt und sofort in Trockeneis schockgefroren. Die so behandelten Bakterien werden bei –80 °C gelagert und halten ihre Kompetenz für etwa ein halbes Jahr. In dieser Zeit können sie für eine Transformation verwendet werden.

2.2.2.4 Transformation elektrokompenter Bakterien

Zur Transformation werden die kompetenten Bakterien auf Eis etwa 20 min aufgetaut. Zu 40 µl der kompetenten Bakterien werden 1-2 µl gereinigter DNS (*) gegeben und vermischt. Das Gemisch wird eine Minute auf Eis inkubiert und anschließend in eine sterile, gekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) gegeben. Hiermit wird es in das Elektroporationsgerät eingesetzt und für 4,5-5 sec bei einer Feldstärke von 12,5 kV/m elektroporiert. Folgend wird sofort 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und vermischt. Die Suspension wird eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 100 µl, 200 µl und 400 µl der Suspension auf Selektionsagar ausplattiert. Nach 2-3 Tagen können die Platten auf Klone kontrolliert werden.

* Nach Carniel: DNS-Konzentrate: 0,5 µg am besten, sinkende Effizienz oberhalb 2 µg (Carniel, *et al.*, 1992)

2.2.3 Plasmid-Entfernung

Für verschiedene Versuche wurden plasmidfreie Mutanten der *Y. pseudotuberculosis* Stämme YPIII und IP32953 benötigt. Für die Herstellung plasmidfreier Mutanten ist ein Mehrschritt-Protokoll anzuwenden, das über die Simulation von Umweltstressbedingungen zum Verlust der Plasmid-DNS aus den Bakterien führt. F-12-Medium und EGTA, das einen Ca²⁺-Mangel bedingt, bieten den Bakterien Umweltstress, der das Wachstum hindert. Die Temperatur von 37 °C ist das Expressionsoptimum des *Yersinia*-Virulenzplasmids. Unter Ca²⁺-Mangel gekoppelt mit dem Plasmid-Synthesestress wachsen pYV-haltige Yersinien wesentlich

langsamer als pYV-freie Yersinien, die das Plasmid nicht repliziert haben bzw. verloren haben.

Es wird eine bakterielle Vorkultur in 5 ml F-12 mit 5 mM EGTA angeimpft und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von der Vorkultur wird eine Hauptkultur in 5 ml F-12 angeimpft. Der Hauptkultur wird ein Antibiotikum zugesetzt, gegen welches ein Resistenzgen auf der chromosomalen DNS des Bakteriums kodiert ist, und bei 27 °C für 6 Stunden inkubiert. Anschließend werden auf LB-Agarplatten mit besagtem Antibiotikum 100 µl, 200 µl und 400 µl ausplattiert und ein Drei-Ösen-Ausstrich angefertigt. Nach 2 Tagen werden die Platten auf Wachstum von Kolonien kontrolliert. Die gewachsenen Kolonien werden auf die Abwesenheit des Virulenzplasmids getestet.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNS

Um Plasmid-DNS aus Bakterien zu isolieren, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Kits verwendet, die sich in ihrem Verfahren geringfügig unterscheiden. Zur Isolierung größerer DNS-Mengen (bis zu 100 µg), zum Beispiel für Klonierungen, wurde das *Nucleobond AX100* Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Reichten kleinere DNS-Mengen (bis zu 20 µg) aus, wie für das Screening von Klonen, wurde das schnellere *QuickDNA* Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet.

Puffer P1	RNase A, pH 8,0	100 µg/ml
	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
Puffer P2	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Puffer P3	KAc, pH 5,5	3 M
Puffer QBT	NaCl, pH 7,0	750 mM
	MOPS	50 mM
	Ethanol	15 %
	Triton X-100	0,15 %

Puffer QC	NaCl, pH 7,0	1 M
	MOPS	50 mM
	Ethanol	15 %
Puffer QF	NaCl, pH 8,5	1,25 M
	Tris HCl	50 mM
	Ethanol	15 %

2.2.5 DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme, genauer Restriktionsendonukleasen, sind Bakterien-Enzyme, welche DNS an bestimmten Positionen schneiden können. Jede Restriktionsendonuklease erkennt eine spezifische DNS-Basensequenz. Entsprechend ihrer Schneide-Eigenschaften unterscheidet man drei Typen, von denen in der Molekularbiologie allerdings nur Restriktionsenzyme vom Typ II Verwendung finden. Diese schneiden die DNS innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz und benötigen kein ATP. Die Erkennungssequenzen bestehen meist aus palindromischen Sequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Der Schnitt kann versetzt sein was sog. *sticky ends* erzeugt oder gerade, wodurch sog. *blunt ends* entstehen. *Sticky ends* sind leichter ligierbar. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Restriktionsenzyme verwendet, die *sticky ends* erzeugen.

Zum Verdau von DNS wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Restriktionsenzym	1 µl (entspricht 2 U/µg DNS)
DNS	1 µg
10 x Restriktionsenzym-Puffer	2 µl
Aqua _{bidest}	ad 20 µl

Reaktionsansatz beim parallelen Einsatz von zwei Restriktionsenzymen:

Restriktionsenzym A	1 µl (entspricht 2 U/µg DNS)
Restriktionsenzym B	1 µl (entspricht 2 U/µg DNS)
DNS	1 µg
Tango-Puffer	2 µl
Aqua _{bidest}	ad 20 µl

Die Ansätze werden bei leichtem Schütteln (300 rpm) im Thermoblock bei 37 °C für 1-3 Stunden, abhängig von den verwendeten Restriktionsenzymen, inkubiert. Anschließend

werden die Enzyme durch eine Inkubation bei 75 °C für 10 min inaktiviert. Die Proben werden mit dem *NucleoSpin Extract* Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach dem dort beschriebenen Protokoll gereinigt und können bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für die weitere Verwendung der entstandenen DNS-Fragmente war meist eine Auftrennung der einzelnen Fragmente mittels Gelelektrophorese und eine folgende Extraktion einzelner Banden aus dem Gel notwendig. Werden größere Mengen an DNS für Klonierungen benötigt, können entsprechende 60 µl-Ansätze vorbereitet werden.

2.2.6 DNS-Agarosegel-Elektrophorese

Die DNS-Gelelektrophorese stellt eine Methode dar, DNS-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und so zu beurteilen. Die Agarose-Konzentration hängt hierbei von der Größe der aufzutrennenden DNS-Fragmente ab, in dieser Arbeit wurden zum größten Teil 1 %-ige Gele verwendet. Zur Herstellung eines Gels wird die entsprechende Menge Agarose in 50 ml TBE-Puffer gegeben und durch kurzes Aufkochen gelöst. Diese Lösung wird in eine vorbereitete Gelschiene gegossen und ein Kamm eingesetzt, so dass im Gel Taschen entstehen, in welche später die Proben eingegeben werden können. Sobald das Gel erstarrt ist, kann es mit der Schiene in eine mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt werden, wobei darauf geachtet werden muss, dass das Gel vollständig mit dem Puffer bedeckt ist. Die zu analysierenden Proben werden 10:1 mit DNS-Stopmix (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % Glycerin) versetzt und 10-15 µl hiervon in die Geltaschen pipettiert. Als Marker wurde „1 kb Plus DNA Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, hiervon werden 7 µl eingesetzt. Die Elektrophorese wird bei 90 V durchgeführt. Das Bromphenolblau erzeugt zwei Farbbanden, die auf der Höhe von 300 bzw. 3000 kb (Kilobasenpaaren) laufen, wodurch sich der Lauf der DNS-Fragmente und somit die nötige Laufdauer einschätzen lässt. Anschließend wird das Gel in einem Ethidiumbromidfärbebad (1 µg/ml) für 20-30 min inkubiert. Das Gel wird mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die aufgetrennten Nukleinsäurebanden sichtbar gemacht werden, da das in diesen interkalierte Ethidiumbromid bei einer Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 254 nm oder 300 nm im sichtbaren Bereich rot-orange (590 nm) fluoresziert. Dies wurde mittels UV-Transilluminator betrachtet und zur Dokumentation fotoarchiviert. Die Fragmentgrößen der einzelnen Banden lassen sich durch den Vergleich mit dem Marker bestimmen.

10xTBE-Puffer	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5M EDTA, pH 8,0	40 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
10 x DNS-Probenpuffer	Glycerin	50 %
	EDTA	0,1 M
	SDS	1 %
	Bromphenolblau	0,1 %
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg Ethidiumbromid pro ml H ₂ O _{dest}	

2.2.7 Gelextraktion von DNS

Um DNS-Fragmente aus einem Restriktionsenzymverdau für weitere Versuche einsetzen zu können, werden die Proben mittels Gelelektrophorese im Agarosegel aufgetrennt. Hierbei ist es sinnvoll zwei Elektrophoresegele anzusetzen, eines mit einer kleinen Probenmenge (5 µl), um die Effizienz des Restriktionsenzymverdaus und die genaue Größe der entstandenen Banden beurteilen zu können. In die zweite Gelelektrophorese wird eine größere Probenmenge (20 µl) eingesetzt, dieses Gel wird für die Gelextraktion genutzt. Damit es in der DNS während des Prozesses zu möglichst wenig Strangbrüchen durch Ethidiumbromid oder UV-Licht kommt, ist es wichtig zu beachten, dass das Gel beidem nur möglichst kurz ausgesetzt wird. Das zweite Gel wird deswegen nur maximal 15 min in dem Ethidiumbromidfärbebad inkubiert. Anschließend wird das Gel auf einen Schneidetisch gelegt, in den eine UV-Lampe eingelassen ist. Hierauf werden die fraglichen DNS-Banden, die durch Einschalten des UV-Lichts sichtbar werden, mit einem scharfen Skalpell möglichst genau ausgeschnitten. Dabei ist zu beachten, dass dies möglichst schnell geschieht, so dass die DNS dem UV-Licht möglichst nicht länger als 20 sec ausgesetzt wird. Um die DNS nun aus dem Agarosegel zu extrahieren, wird das Gelextraktions-Kit *Nucleo Spin Extract II* (Macherey-Nagel, Düren) genutzt und nach dem dort beschriebenen Protokoll gearbeitet. Die

derart vorbereiteten Proben können nun in eine Ligation eingesetzt oder bei 4 °C gelagert werden.

2.2.8 Ligation von DNS-Fragmenten

In einer Ligation werden DNS-Fragmente miteinander verbunden. Diese DNS-Fragmente werden zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut und wie zuvor beschrieben aufgearbeitet. In der Ligationsreaktion kommt es zum Annealing der durch das Restriktionsenzym entstandenen komplementären *sticky ends* zweier DNS-Fragmente. Die T4-DNS-Ligase schließt dann unter ATP-Verbrauch die zwischen den Fragmenten vorhandene Lücke in der Phosphatkette und führt somit zu einem stabilen neuen DNS-Produkt. Bei der Ligation eines Inserts mit einem Vektor wurde in dieser Arbeit die dreifache molare Menge Insert-DNS zur Vektor-DNS hinzugefügt.

Es werden 20 µl Ligationsansätze wie folgt zusammengestellt:

1 µl T4-DNS-Ligase, 2 µl Ligase-Puffer, 100 ng Vektor-DNS, dreifache molare Menge an Insert-DNS. Zum Auffüllen auf 20 µl wird Tris-Puffer, pH 8,6 verwendet.

Die Proben werden über Nacht im 11 °C kühlen Wasserbad inkubiert und am nächsten Morgen für eine Transformation verwendet.

2.2.9 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung eines spezifischen DNS-Abschnitts mithilfe einer thermostabilen DNS-Polymerase, Nukleotiden und spezifischen Primern (Mullis, *et al.*, 1986; Saiki, *et al.*, 1988). Unter einem Primer versteht man eine einzelsträngige Nukleotidsequenz, die von der DNS-Polymerase als Startpunkt der DNS-Synthese erkannt wird. Der PCR-Prozess besteht im Mittel aus etwa 30 Zyklen mit je drei Schritten. Hierbei wird, wie folgend beschrieben, durch Temperaturänderung die Aktivität der DNS-Polymerase und die Bindung der DNS-Einzelstränge aneinander beeinflusst.

Denaturierung:

Jeder Zyklus beginnt mit einer Temperaturerhöhung auf 94 - 96 °C, wodurch es zur Denaturierung der Template-DNS kommt. Hierbei lösen sich durch Aufbruch der Wasserstoffbrückenbindungen die beiden Doppelstränge voneinander.

Annealing:

Die Temperatur wird auf einem Wert gehalten, der eine spezifische Anlagerung der Primer an die komplementären DNS-Bereiche erlaubt. Dieser Temperaturwert wird durch Länge und Sequenz der Primer bestimmt (siehe 2.2.9 Primerdesign). Zu niedrige Temperaturen führen unspezifischer Anlagerung der Primer und damit unspezifischen Banden. Zu hohe Temperaturen führen zu einer unzureichenden Anlagerung der Primer und damit zu fehlender oder unzureichender Produktbildung.

Amplifikation:

Durch eine Temperaturerhöhung wird die DNS-Polymerase aktiviert. Die DNS-Polymerase erkennt das 3'-Ende der angelagerten Primer und synthetisiert der Template-DNS entsprechend eines komplementären DNS-Strangs, wobei der Primer nicht wieder abgelöst wird, sondern den Anfang des neu synthetisierten DNS-Strangs bildet. Das Arbeitsoptimum der DNS-Polymerase liegt hierbei meist zwischen 68 °C bis 72 °C.

Im ersten Zyklus entstehen pro Ausgangsdoppelstrang zwei neue DNS-Stränge. Diese sind von der Primersequenz ausgehend doppelsträngig. Im zweiten Zyklus liegen somit nach dem Denaturieren neben der Ursprungs-DNS in gleicher Anzahl DNS-Stränge als neue Matrix vor, die nur noch am 3'-Ende überlang sind, am 5'-Ende aber schon entsprechend der Primersequenz enden. Lagern sich nun an diese entsprechend die gegenläufigen Primer an entsteht durch Amplifikation ein DNS-Strang, der nur über die durch die Primer begrenzte Sequenz doppelsträngig ist. Mit jedem weiteren Zyklus vermehren sich folgend die DNS-Fragmente in gewünschter Länge exponentiell, da jedes neue Produkt im nächsten Zyklus als Matrize zur Verfügung steht. Da während dieser Zyklen durch Strangbrüche auch in gewissem Maße kürzere Fragmente anfallen, die sich während der späten Zyklen zunehmend anhäufen, hat sich eine Wiederholung von 30 Zyklen als am praktikabelsten erwiesen. Der letzte Zyklus endet mit einer um etwa 7 min verlängerten Amplifikationsphase, um zu ermöglichen, dass bis dahin nicht vollständig amplifizierte Sequenzen vervollständigt werden. Als Ausgangsmaterial für die PCR kann präparatorisch aufbereitete, somit reine DNS dienen oder aufgekochtes Gesamtzelllysats. Zur Herstellung eines Gesamtzelllysats wurde 1 µl einer bakteriellen Übernachtskultur in 50 bis 500 µl Aqua_{bidest} abhängig vom genetischen Material aufgenommen (hohe Verdünnungen für Multi-Copy-Plasmid-PCRs und niedrige für Low-Copy-Plasmid-PCRs oder chromosomale PCRs), für 10 Minuten aufgekocht, danach abgekühlt und zentrifugiert. Reine DNS wurde entsprechend 1:50 bis 1:1000 in Aqua_{bidest} verdünnt. Alle Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, München) synthetisiert.

Soweit nicht anders beschrieben wurde der Reaktionsansatz wie folgt eingesetzt:

10x PCR-Puffer (Perkin-Elmer)	5 µl
2 mM dNTP-Mix (dTAP, dCTP, dGTP, dTTP)	5 µl
100 µM Primer 1	0,5 µl
100 µM Primer 2	0,5 µl
Taq-Polymerase (Perkin-Elmer)	0,25 µl
DNS	2,5 µl
Aqua _{bidest}	ad 50 µl

Beim Zusammenstellen des Reaktionsansatzes muss darauf geachtet werden, dass die DNS-Polymerase erst kurz vor Reaktionsstart zugegeben wird, da diese sehr empfindlich ist.

Soweit nicht anders beschrieben wurde die PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Start-Denaturierung:	94 °C	5 min
30 Zyklen:	Denaturierung:	94 °C 1 min
	Annealing:	56 °C 45 sec
	Amplifikation:	72 °C 1 min
Nachamplifikation:	72 °C	7 min
Abkühlung:	4 °C	bis zum Abbruch

Die entstandenen PCR-Produkte wurden entweder direkt zur Visualisierung auf ein Agarosegel aufgetragen oder zur weiteren Verarbeitung mit dem NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach dem dort beschriebenen Protokoll gereinigt und bei 4 °C gelagert.

2.2.10 Primerdesign

Ein Primer ist ein kurzes synthetisches Oligonukleotid, welches in verschiedenen Methoden wie zum Beispiel der PCR oder DNS-Sequenzierung Anwendung findet. Ein Primer wird so konstruiert, dass er gegenläufig zu der Sequenz der Template-DNS ist, an die er sich anlagern soll. Beim Design eines Primers müssen verschiedene Aspekte bedacht werden. In der Praxis hat sich herausgestellt, dass ein Primer etwa eine Länge von 17 bis 28 Basen haben sollte. Er sollte zu etwa 60 % aus Guanin und Cytosin bestehen, wobei wichtig ist, dass gerade das 3'-Ende G-C-reich ist und mit einem Guanin oder Cytosin endet. Gleichzeitig muss aber bedacht werden, dass eine drei- oder mehrfache Wiederholung von Guanin oder Cytosin am 3'-Ende ein Fehlpriming an G-C-reiche Regionen begünstigen kann und deswegen vermieden werden

sollte. Schmelztemperaturen zwischen 55 – 65 °C sind vorzuziehen. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass keine Selbstkomplementarität innerhalb eines Primers besteht, was u.a. zu Hairpin-Bildung führen kann. Da während der einzelnen PCR-Zyklen auch immer wieder nicht-vervollständigte PCR-Produkte entstehen und sich dieser Fehler mit den nächsten Zyklen vervielfältigt, sollte darauf geachtet werden, dass eventuell eingefügte Mutationen in den Primern einen gewissen Abstand zum 5'-Ende des Primers haben und dass die Primer so konstruiert werden, dass sie sich möglichst neben den gesuchten DNS-Regionen anlagern. Die Schmelztemperatur eines Primers lässt sich durch seine Länge und den jeweiligen Gehalt an Guanin, Cytosin, Adenosin und Thymin berechnen. Eine einfache in der Praxis oftmals angewendete Methode, um die Schmelztemperatur eines Primers abzuschätzen, besteht darin, die Anzahl der einzelnen Basen zu bestimmen und pro Guanin und Cytosin 4 °C, pro Adenosin und Thymin 2 °C zu berechnen und dies zu addieren:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 4(\text{G}+\text{C})+2(\text{A}+\text{T}) \text{ (Suggs, et al., 1981).}$$

2.2.11 Mutagenese-PCR

Diese Methode ist hilfreich, wenn man zum Beispiel eine Restriktionsenzym-Schnittstelle an ein PCR-Produkt anfügen will. Zu diesem Zweck werden Primer so konstruiert, dass die Sequenz der gewünschten Schnittstelle an günstiger Stelle in die Primersequenz eingefügt wird. Es sollten möglichst kleine Änderungen der zur Template-DNS komplementären Sequenz gewählt werden, um die Anlagerung des Primers an die Template-DNS möglichst wenig zu stören. Die Primer werden wie gewohnt in eine PCR eingesetzt und die Annealing-Temperatur entsprechend der Länge und Zusammensetzung des mit der Template-DNS komplementären Primerabschnitts gewählt. Das hierbei entstehende PCR-Produkt wird anschließend aufgereinigt und kann dann in einen Restriktionsenzym-Verdau eingesetzt werden, um später beispielsweise in ein Plasmid ligiert zu werden.

2.2.12 Mutagenese bakterieller Plasmid-DNS mittels linearer PCR-Fragmente (ET-Rekombination)

Bei der Klonierung der beiden *yadA*-Knockout-Mutanten der *Y. pseudotuberculosis*-Stämme IP32953 und YPIII kam die Methode der ET-Rekombination zum Einsatz. Der Begriff ET-Rekombination oder „ET-Cloning“ bezieht sich auf die *E. coli*-Rekombinasen RecE und RecT, mittels welcher nach der Erstbeschreibung der Methode größere Sequenzen bis ganze Gene ausgetauscht werden können (Zhang, et al., 1998). Eine Weiterentwicklung der

Methode nutzt hierfür die Lambda-Phagen-Rekombinasen Red- α , Red- β und Red- γ (Zhang, *et al.*, 2000). Die hier angewendete Methode stellt eine Variante des vereinfachten Protokolls von Datsenko und Wanner dar (Datsenko, *et al.*, 2000). Es wurde auf den abschließenden Schritt der Deletion der Antibiotika-Resistenz-Kassette verzichtet, da diese für die weitere Verwendung der Plasmide gebraucht wurde.

Die Methode beruht auf dem Austausch eines DNS-Bereichs mittels homologer Rekombination. Es werden in einer PCR DNS-Fragmente produziert, die eingerahmt werden von Sequenzen, welche mit den Sequenzen, die den auszutauschenden DNS-Bereich begrenzen, übereinstimmen. Um später eine Selektion vornehmen zu können, kodiert die Sequenz zwischen den Homologie-Bereichen für eine Antibiotika-Resistenz, in dieser Arbeit für eine Kanamycin-Resistenz (siehe Abb.5). Dieses PCR-Produkt wird aufgereinigt und mit dem Restriktionsenzym DpnI inkubiert, um die Template-DNS zu entfernen. Die DNS wird präzipitiert und gewaschen und schließlich in Aqua_{bidest} aufgenommen.

PCR- und Aufreinigungs-Protokoll:

10x PCR-Puffer (Perkin-Elmer)	5 μ l
2 mM dNTP-Mix (dTAP, dCTP, dGTP, dTTP)	5 μ l
100 μ M Primer: pACYC177-Kana_IP-315_DW-f	0,5 μ l
100 μ M Primer: pACYC177-Kana_IP-1159_DW-r	0,5 μ l
Taq-Polymerase (Perkin-Elmer)	0,25 μ l
Plasmid-DNS: pACYC 177	2,5 μ l
Aqua _{bidest}	ad 50 μ l

Es werden 35 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Start-Denaturierung:	94 °C	5 min
18 Zyklen:	Denaturierung: 94 °C	30 sec
	Annealing: 56 °C bis 45 °C	2 min
	(um 1 °C pro Zyklus senken)	
	Amplifikation: 68 °C	2 min
17 Zyklen:	Denaturierung: 94 °C	30 sec
	Annealing: 45 °C	2 min
	Amplifikation: 68 °C	2 min
Abkühlung:	4 °C	bis zum Abbruch

Die Aufreinigung der DNS erfolgte mittels des *Ultra Clean Gel Spin* Reinigungskits von MoBio (Carlsbad, USA). Die DNS wird in 50 μ l Aqua_{bidest} aufgenommen. Zu der eluierten DNS werden 6 μ l 10x DpnI-Reaktions-Puffer und 2 μ l DpnI (10 U/ μ l) zugegeben und der

Reaktionsansatz für 90 min bei 37 °C inkubiert. Zur Präzipitation der DNS werden 180 µl 100 %-iges Ethanol und 6 µl 3 M Natriumacetat zugegeben und dieses Gemisch bei –80 °C für 15-30 min inkubiert. Folgend wird es 15 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 10 µl Aqua_{bidest} aufgenommen. In den Stamm, auf dessen Plasmid ein solcher Austausch erfolgen soll, muss zuvor das Plasmid pKD46 eingebracht werden. Dies erfolgte mittels Elektrotransformation (siehe 2.2.2.4). Das Plasmid pKD46 kodiert für die Rekombinasen Red- α , Red- β und Red- γ . Diese Proteine haben eine Exonuklease- und Annealing-Protein-Funktion und sind notwendig für die homologe Rekombination. Der hieraus gewonnene Stamm muss ebenfalls elektrokompent gemacht werden (siehe 2.2.2.3). Das Medium für die hierfür angeimpfte Hauptkultur muss neben den Selektionsantibiotika auch 0,1 % L-Arabinose enthalten. Diese induziert die Expression von Red- α , Red- β und Red- γ . Die elektrokompenten Bakterien können bei –80 °C gelagert werden.

Das aufgereinigte PCR-Produkt wird mittels Elektroporation in die vorbereiteten Bakterien eingebracht. Zur Elektrotransformation werden 500 µl der elektrokompenten Yersinien und 10 µl der eluierten DNS eingesetzt. Anschließend werden die transformierten Bakterien für 90 min bei 150 rpm im Thermoschüttler inkubiert, in dieser Zeit sollen die Bakterien ihre Kanamycin-Resistenz exprimieren. Dann werden 100 µl, 200 µl und 400 µl der Suspension auf Kanamycin-haltigem LB-Agar ausplattiert, für 2-3 Tage bei 27 °C inkubiert und die gewachsenen Klone mittels PCR-Screening und Sequenzierung auf eine erfolgte Deletion untersucht.

2.2.13 Konstruktion von Plasmiden und Stämmen

Ein großer Teil der Experimente wurde mit einer bereits vorhandenen Sammlung verschiedener Stamm- und Plasmid-Konstrukte von *Y. enterocolitica* durchgeführt. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit *yadA*-defiziente Varianten der *Y. pseudotuberculosis*-Stämme IP32953 und YPIII erstellt, um ihr Verhalten im Mausinfektionsmodell mit dem der *Y. enterocolitica*-Mutanten zu vergleichen. Weiter wurden die *yadA*-Gene aus den pYV-Plasmiden in das Plasmid pAC-F kloniert und in den Stamm *Y. enterocolitica* WA-C Δ *inv* eingebracht. Diese Stämme exprimieren außer *YadA* keine weiteren Virulenzfaktoren und wurden für die verschiedenen in-vitro-Studien genutzt, um so den Einfluss von *YadA* isoliert beurteilen zu können.

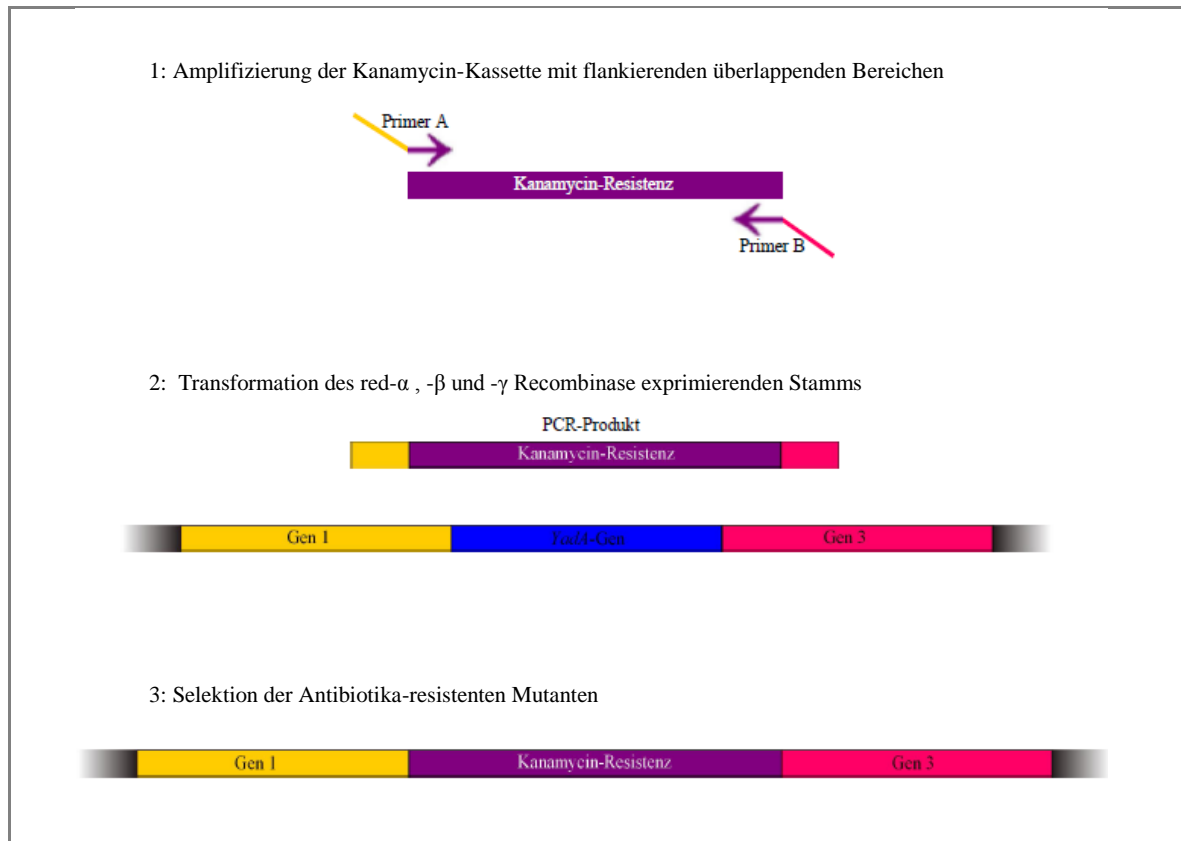


Abb.5: Schematische Darstellung der Hauptschritte der ET-Rekombination (nach Datsenko & Wanner, 2000)

2.2.13.1 Verwendung von *E. coli*-Stämmen mit pGPS-Plasmiden

In Vorarbeiten stellte N. Ackermann *yadA*-Varianten-tragende Plasmide her, indem zunächst die *yadA*-Gene der *Y. enterocolitica*-Stämme 8081 und 108-p und der *Y. pseudotuberculosis*-Stämme IP32953 und YPIII ohne ihre jeweilige Siganlsequenz in das Suizidplasmid pGPS-SS einbrachte. Dieser Vektor enthält vom *Y. enterocolitica* O:8 WA-314-*yadA*-Gen lediglich die Signal- und Terminator-Sequenz enthält, wodurch die Voraussetzung für eine einheitliche stammspezifische YadA-Synthese und -Sekretion geschaffen ist. Hierbei entstanden die Plasmide pGPS-8081, pGPS-108-p, pGPS-IP32953 und pGPS-YPIII.

Weiterhin konstruierte N. Ackermann zwei *yadA*-Hybrid-tragende Plasmide, pGPS:IP32953H und pGPS:YPIIIH, mit Hilfe von pGPS-A-H. Bei pGPS-A-H handelt es sich um das Suizidplasmid mit WA-314-YadA ohne bp 88-565, was der *yadA*-Kopfreion entspricht (Ackermann, 2005; Roggenkamp, *et al.*, 2003). Für die Konstruktion der *yadA*-Hybride wurden von den *yadA*-Genen der Stämme IP32953 und YPIII die *yadA*-Abschnitte amplifiziert, welche für die jeweilige Kopf-Region kodieren. Die PCR-Produkte wurden aufgrund der gewählten Primer durch *SacI*-Schnittstellen begrenzt (Primer siehe 2.1.6). Beide

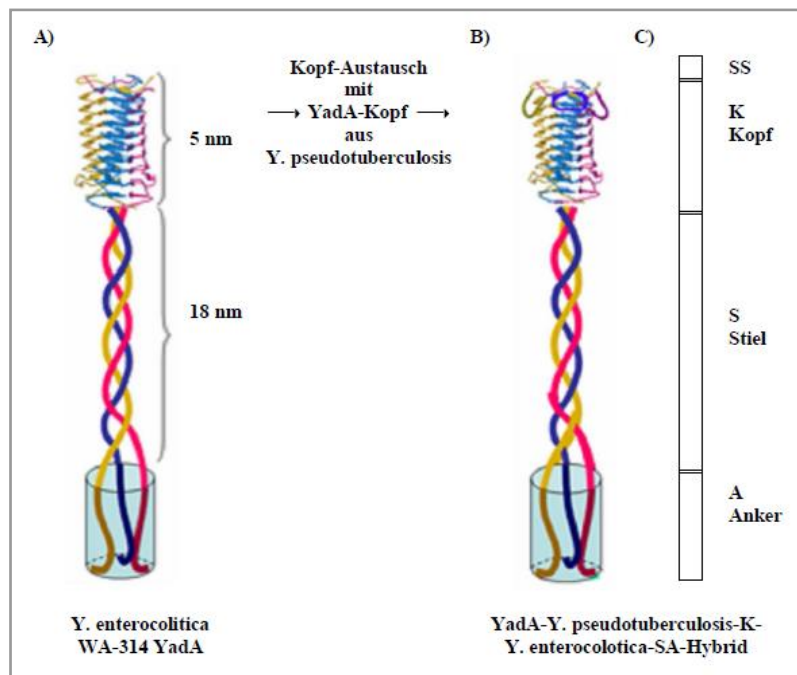


Abb.6: Darstellung des modularen Aufbaus des Oca-Proteins YadA (A) und des geplanten Austauschs (B) der Kopf-Region (K) von *Y. enterocolitica* WA-314 YadA durch die Kopf-Region von *Y. pseudotuberculosis* Typ III: A) komplettes Oca-Protein YadA aus *Y. enterocolitica* O:8 (Stamm WA-314) aus den Strukturmodulen Kopf (K), Stiel (S) und Membrananker (A); B) Austausch des Kopfes von A) durch die Kopf-Domäne von *Y. pseudotuberculosis* Typ III; C) Aufbau des YadA-Gens (SS=Signalsequenz) (aus Heesemann & Ackermann, 2007)

PCR-Produkte wurden mit SacI verdaut und jeweils in das ebenfalls mit SacI geöffnete Plasmid pGPS-A-H kloniert wodurch die Plasmide pGPS:IP32953H und pGPS:YPIIIH entstanden (Abb.6). Alle hier beschriebenen pGPS-Plasmide wurden schließlich in den *E. coli* Stamm SM10 λ pir transformiert (2.1.5.1).

2.2.13.2 Verwendung von *Y. enterocolitica*-Stämmen mit modifizierten pYV-Plasmiden

Für die Mausinfektionsversuche wurden die von N. Ackermann erstellten *Y. enterocolitica*-Stämme WA 314 pYV-AS, pYV-A1, pYV-AS-8, pYV-AS-3, pYV-AS-I, pYV-ASS-I, pYV-AS-III und pYV-ASS-III verwendet (Nägele, 2010; Roggenkamp, *et al.*, 1995a; Roggenkamp, *et al.*, 2003). Diese entstanden durch Konjugation des jeweiligen pGPS-Suizidplasmid tragenden *E. coli*-Stammes mit der *yadA*-negativen Yersinie WA-314 pYV-A0, wie beschrieben bei Roggenkamp *et al.*, 1995.

2.2.13.3 Erzeugung einer plasmidlosen Variante von *Y. pseudotuberculosis* YPIII

Mittels der Methode der „Plasmid-Heilung“ entstand eine plasmidlose Variante von *Y. pseudotuberculosis* YPIII und IP32953 (2.2.3). Diese Stämme sind folglich defizient für alle pYV-plasmidkodierten Gene.

2.2.13.4 Konstruktion von *Y. enterocolitica*- und *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen mit pACYC-Plasmiden

Für In-vitro-Studien wurden Stämme benötigt, die es erlaubten die Rolle der YadA-Varianten ohne den Einfluss zusätzlicher Virulenzfaktoren, wie dem chromosomal kodierten Invasin und der anderen auf dem Virulenzplasmid kodierten Faktoren zu untersuchen. Hierfür wurden die *yadA*-Varianten und die *yadA*-Hybride in das Plasmid pAC-F kloniert. Dieses Plasmid basiert auf pACYC184 und besitzt das *virF*-Gen, das für den *yadA*-Transkriptionsaktivator VirF kodiert (*virF*-Promotorregion; 151 bp vor dem *virF* und das komplette *virF*-Gen mit 86bp der Terminatorregion) (Chang, *et al.*, 1978; Nägele, 2010). Die *yadA*-Varianten und -Hybride wurden aus den entsprechenden Plasmiden mit den Oligonukleotiden A-144f-XbaI und A-119r-BamHI amplifiziert und mit XbaI und BamHI verdaut. Diese Fragmente wurden in den mit BamHI und XbaI eröffneten Vektor pAC-F ligiert und als pAC-F-AS-8, pAC-F-AS-3, pAC-F-AS-I, pAC-F-ASS-I, pAC-F-AS-III und pAC-F-ASS-III bezeichnet. Die Plasmide pAC-F und pAC-F-A1 stammen aus der Dissertation von V. Nägele (Nägele, 2010). Sie entsprechen den dort als pACYC184:*virF* (pAC-F) und pACYC184:*virF*:*yadA* (pAC-F-A1) bezeichneten Plasmiden. pAC-F wurde kloniert, indem in das Plasmid pACYC184 mittels Sall- und SphI-Schnittstelle das *virF*-Gen von WA-314 eingebracht wurde. Für die Konstruktion von pAC-F-A1 wurde *yadA* mit den Oligonukleotiden A-144f-XbaI und A-119r-BamHI aus dem Plasmid pGPS-A1 amplifiziert und über XbaI und BamHI in pAC-F ligiert (Nägele, 2010). Alle Plasmide wurden erst in den Ca²⁺-kompetenten *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert, bevor sie dann weiter in elektrokompente *Y. enterocolitica* WA-C Δ *inv* transformiert wurden. *Y. enterocolitica* WA-C Δ *inv* stellt eine *Invasin*-defiziente Mutante der plasmidlosen *Y. enterocolitica* WA-C dar (Ruckdeschel, *et al.*, 1996).

2.2.13.5 Konstruktion der *yadA*-defizienten *Y. pseudotuberculosis*-Stämme

Mittels der Methode der ET-Rekombination wurde das *yadA*-Gen in den *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen IP32953 und YPIII durch Austausch gegen eine Kanamycin-

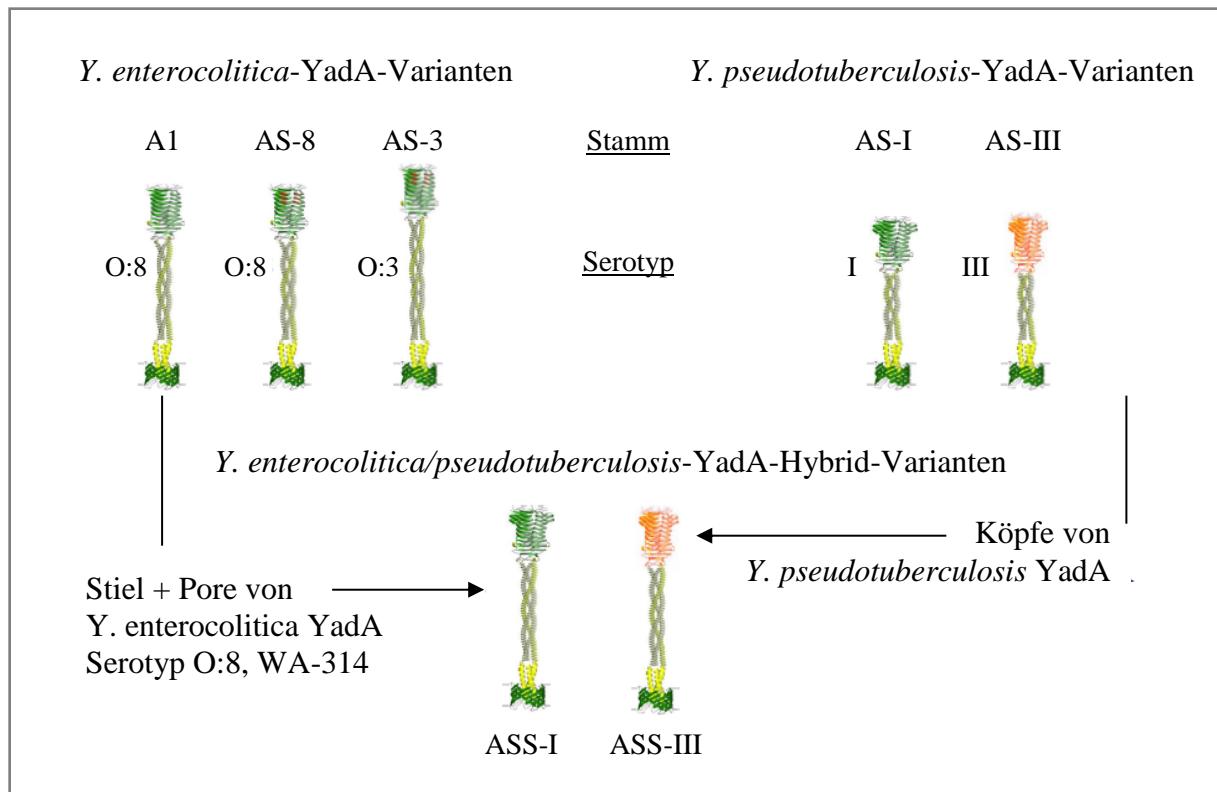


Abb.7: Schematische Darstellung der klonierten YadA-Varianten und –Hybride (aus Heesemann & Ackermann, 2007). *Y. enterocolitica* YadA-Varianten unterscheiden sich durch die Länge des „Stiels“. *Y. pseudotuberculosis* YadA-Varianten haben nach bioinformatischen Vorhersagen eine voluminösere Kopfstruktur als die von *Y. enterocolitica*.

Kassette deletiert (2.2.12). Hierfür wurde das Gen für die Kanamycin-Resistenz von pACYC177 mittels spezieller Primer amplifiziert, welche der N-terminalen (forward-Primer) bzw. C-terminalen (reverse-Primer) Grenzregionen des *yadA*-Gens entsprechen. Durch Selektionsdruck und Hilfestellung der auf dem Plasmid pKD46 kodierten Enzyme erfolgte der Austausch des *yadA*-Gens gegen die Kanamycin-Kassette. Die so entstandenen Plasmide pYV32953::kanΔ*yadA* und pIB1::kanΔ*yadA* sind folglich *yadA*-defizient.

2.2.14 DNS-Sequenzierung

Zur Sequenzierung aller neuklonierten Stämme wurden ihre Plasmide isoliert. Hierfür wurden 10 µl einer Lösung von 50-80 ng/µl der isolierten DNS mit 4 µl eines forward-Primers bzw. eines reverse-Primers, die die entsprechende Region begrenzen, zusammengegeben. Diese Proben wurden an die Firma Agowa (Berlin) geschickt und dort als Auftragsleistung sequenziert.

2.2.15 Stammkonservierung

Zur Konservierung aller neukonstruierten Stämme wurden 3 ml-Übernachtskulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Kolonie beimpft und bei 27 °C (Yersinien) bzw. 37 °C (*E. coli*) inkubiert. Diese wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 2 min). Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Probe wurde in einem Eppendorf-Gefäß bei –80 °C in der Stammsammlung eingefroren.

2.2.16 Isolierung von bakteriellen Außenmembranproteinen (Outer Membrane Proteins, OMP)

Um YadA in der Außenmembran nachzuweisen, wurden die Proteine der äußeren Zellmembran der Yersinien isoliert.

Die Bakterien werden mittels physikalischer (Zentrifugation) und chemischer Trennschritte (Detergens) fragmentiert und so die Außenmembran isoliert. Hierfür werden die Bakterien mit Lysozym vorbehandelt, welches durch Hydrolyse des Mureins, das die Formstabilität der Bakterien vermittelt, zu Zellwanddestruktion führt. Zusätzlich werden die Bakterien mit EDTA und Sucrose inkubiert. EDTA entzieht der Zellmembran durch Komplexbildung Ca^{2+} und Mg^{2+} , was dazu führt, dass diese permeabler wird. Die Sucrose bedingt eine hyperosmolare Umgebung und damit Druckausgleich zum Zytoplasma. Ein vorzeitiges Platzen der Bakterienzelle wird verhindert. Durch das Zusammenwirken dieser Einflüsse verformen sich die Stäbchenbakterien zu kugelförmigen Sphäroblasten. Durch die Zugabe von Wasser und mittels Ultraschall werden die Bakterien destabilisiert und platzen. Von diesem Bakterienlysats wird durch Zentrifugieren (2000 x g) der verbleibenden Zelldebris als Pellet abgetrennt. Der Überstand wird nochmals hochtourig zentrifugiert, wobei sich die Gesamtmembran als Pellet absetzt. Diesem Pellet wird das Detergens Triton X-100 zugesetzt, welches die lipidreiche Innenmembran solubilisiert. Durch Zugabe von MgCl_2 wird die Außenmembran stabilisiert und nach Zentrifugation isoliert. Das Pellet wird in Aqua_{bidest} resuspendiert. Der Proteingehalt der OMP-Suspension wird bestimmt und die Proteine mit einer SDS-PAGE aufgetrennt.

Für die Isolierung der Außenmembranproteine wird eine 6 ml Vorkultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Kolonie des zu untersuchenden Stammes beimpft und über Nacht bei 27 °C inkubiert. Folgend wird eine 600 ml Hauptkultur, ebenfalls in LB-Medium mit Antibiotikum, 1:100 mit der Vorkultur beimpft und für sechs Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator angezüchtet. Anschließend wird sie für 15 min bei 4 °C und

2000 x g abzentrifugiert. Das Pellett wird mit Waschpuffer zweimal gewaschen und anschließend in 3 ml Puffer I auf Eis resuspendiert. Der Suspension werden 6 ml Puffer II, 60 µl Puffer III und 19,2 ml Aqua_{bidest} zugesetzt. Dies Gemisch wird bei Raumtemperatur (RT) 15 min unter leichtem Schwenken inkubiert, so dass sich Sphäroblasten ausbilden. Anschließend wird die Probe für 45 sec (3 x 15 sec mit 10 sec Pausen) im Ultraschallbad beschallt. Dann wird die Probe für 40 min bei 1600 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Bakterienpellet verworfen. Der Überstand wird bei 6000 x g für 40 min zentrifugiert. Das Pellet (OMP und andere Membranbestandteile) wird mit Aqua_{bidest} gewaschen und erneut zentrifugiert (1 h, 6000 x g). Das Pellet wird in 30 ml Extraktionspuffer aufgenommen und 20 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wird die Probe bei 6000 x für 40 min zentrifugiert. Das Pellet (OMP) wird zweimal mit 5 ml Aqua_{bidest} gewaschen (30 min, 6000 x g). Anschließend wird das Pellet in 300 µl Aqua_{bidest} aufgenommen. Die Probe kann zur Lagerung bei -20 °C eingefroren werden. Folgend wird die in der Suspension enthaltene Proteinkonzentration mithilfe der Methode nach Lowry (siehe 2.2.19) bestimmt und in Analyse-SDS-PAGEs je 10 µg Protein pro Spur eingesetzt.

Waschpuffer	Tris	50 mM
	MgCl ₂	1 mM
Puffer I	Tris/HCL pH 8,0	200 mM
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Puffer II	Tris/HCL pH 8,0	200 mM
	Sucrose	1 M
	EDTA	1 mM
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Puffer III	Lysozym, pH 8,0	2 mg/ml
	Puffer I	ad 1 ml
Extraktionspuffer	Tris HCl, pH 8,0	6,1 g
	MgCl	2,0 g
	Triton X-100	20 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

2.2.17 Proteinmengenbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration in der OMP-Präparation wurde mittels einer Variante der 1951 von Lowry et al. etablierten Methode (Markwell, *et al.*, 1978) bestimmt. Lowrys Protokoll ermöglicht eine einfache und zuverlässige Bestimmung der Konzentration löslicher sowie unlöslicher Proteine (Lowry, *et al.*, 1951).

Zunächst wird die Probe mit einem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz versetzt, mit welchem die Proteine eine Verbindung eingehen, die dem Biuret-Komplex ähnelt. Folgend wird der Probe das Folin-Ciocalteu-Reagenz zugegeben, welches durch die mit Cu^{2+} komplexierten Proteine reduziert wird. Als Reduktor wirkt einerseits das im Kupfer-Protein-Komplex vermutlich zu Cu^+ reduzierte Kupferion und andererseits die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan, ohne vorherige Komplexbildung mit dem Cu^{2+} -Reagenz. Durch die Reduktion kommt es zu einem Farbumschlag von Gelb zu Blau, der zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt wird. Zum Erstellen einer Eichgeraden werden mehrere Proben (z. B. Albumin) mit bekannter Proteinkonzentration eingesetzt und die Extinktion der Blau-Färbung bestimmt. Die gemessene Extinktion wird als Funktion der Proteinkonzentration der Eichproteinlösungen graphisch dargestellt und der Extinktionskoeffizient aus dem Anstieg der resultierenden Geraden ermittelt. Mit diesem kann nun für eine beliebige Probe mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes die Proteinkonzentration berechnet werden.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt: $E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} * c * d$

E_{λ} - Extinktion bei der Wellenlänge λ ; ϵ_{λ} - molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ ; c - Konzentration;
 d - Schichtdicke

Es wird eine Albuminstammlösung angesetzt, indem man 10 mg Rinderserumalbumin (BSA) in 100 ml $\text{Aqua}_{\text{bidest}}$ löst. Diese hat eine Proteinkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$. Folgend wird eine Verdünnungsreihe von 10 $\mu\text{g/ml}$ – 20 $\mu\text{g/ml}$ – 30 $\mu\text{g/ml}$ – 50 $\mu\text{g/ml}$ – 90 $\mu\text{g/ml}$ (jeweils 1 ml) vorbereitet, sowie 1 ml $\text{Aqua}_{\text{bidest}}$ zur Bestimmung des Leerwerts. Von den Membranpräparationen, deren Proteinkonzentration bestimmt werden soll, werden 2:100-Verdünnungen in $\text{Aqua}_{\text{bidest}}$ angesetzt (je 1 ml). Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Man gibt zu allen Proben jeweils 3 ml Reagenz C, vermischt sie gründlich und lässt sie 10 min bei RT inkubieren. Danach gibt man zu jeder Probe 300 μl einer 50 %-igen Folin-Lösung, vermischt sie abermals kräftig und lässt sie 45 min bei RT inkubieren. Folgend wird

die Extinktion des entstandenen blauen Farbstoffs bei 750 nm am Absorptionsspektralphotometer bestimmt.

Reagenz A	Na ₂ CO ₃	2 %
	NaOH	0,4 %
	KNa-Tartrat	0,16 %
	SDS	1 %
Reagenz B	CuSO ₄ x 5H ₂ O	4 %
Reagenz C	Reagenz A	100 ml
	Reagenz B	1 ml
	(erst kurz vor Gebrauch mischen)	
Folin-Lösung	50 %-Folin-Ciocalteu-Reagenz in H ₂ O	

2.2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE stellt eine Methode dar, um denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Dies geschieht in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Laemmli), wofür eine gründliche Denaturierung und Ladungsangleichung der Proteine wichtig ist. Hierfür werden die Proteine zur Denaturierung 10 min aufgekocht (100°C) und durch Zugabe von β -Mercaptoethanol eine Spaltung von Disulfidbrücken bewirkt. Die Ladungsangleichung erfolgt durch Inkubation mit Natriumdodecylsulfat (SDS), welches durch seine negative Ladung die Eigenladungen der Proteine ausgleicht. Die Proben werden in SDS-Probenpuffer mit Bromphenolblau und β -Mercaptoethanol aufgenommen und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, in dem sie bei einer Stromstärke von 15 mA und einer Spannung von 180 V entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt wurden. Das Bromphenolblau dient hierbei dazu, den Lauf der Banden zur Anode sichtbar zu machen. Um deutlichere Proteinbanden zu erzielen, hat es sich bewährt ein Gel zu nutzen, das aus zwei verschiedenen Anteilen besteht. So gießt man in einem vertikalen System zuerst ein Trenngel von etwa 6 cm Höhe, dieses ist der Anteil, in welchem die Proteine aufgetrennt werden. Der zweite Anteil, das Sammelgel von etwa 1 cm Höhe, welches über dem Trenngel gegossen wird, dient dem gleichmäßigen Einlaufen und Sammeln der Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Laufgel. Als Marker wird ein Proteinmix mit definierten Molekulargewichten

im Bereich von 10 bis 220 kDa („BenchMark“, Invitrogen) verwendet. Der Gellauf wird beendet, sobald die Farbfront das untere Ende des Gels erreicht hat. Bei 80 V dauert dies etwa 90 bis 120 min.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit sämtliche im Gel vorhandenen Proteine in einer Coomassie-Färbung darzustellen oder anhand eines Immunoblots gezielt bestimmte Proteine mit einem gegen sie gerichteten Antikörper enzymatisch sichtbar zu machen. In dieser Arbeit waren die SDS-Gele Ausgangsprodukt für einen Immunoblot und wurden im Anschluss mit Coomassie gefärbt (Darstellung der Restproteine). Da während des elektrophoretischen Transfers nicht alle Proteine vollständig auf die Membran übertragen werden, ist die anschließende Gelfärbung sinnvoll.

30 % Acrylamid-Lösung:	Acrylamid	44 g
	Bisacrylamid	0,8 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
4 % Sammelgel:	250 mM Tris, pH 6,8	2,5 ml
	30 % Acrylamid	0,5 ml
	10 % SDS	0,1 ml
	H ₂ O _{dest.}	1,9 ml
	<i>zum Polymerisationsstart:</i>	
	10 % APS	30 µl
	TEMED	30 µl
11 % Trenngel:	750 mM Tris, pH 8,8	5,0 ml
	30% Acrylamid	2,5 ml
	10 % SDS	0,2 ml
	H ₂ O _{dest.}	2,3 ml
	<i>zum Polymerisationsstart:</i>	
	10 % APS	40 µl
	TEMED	20 µl
10 x Laufpuffer nach Laemmli:	Tris-HCl	30,2 g
	Glycin	142,6 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

(1 x Laufpuffer nach Laemmli zusätzlich angesetzt mit 0,1 % SDS)

SDS-Probenpuffer:	Tris-HCl, pH 6,8	125 mM
(Stopmix)	SDS	4 %
	Glycerin	20 %
	β -Mercaptoethanol	2 %
	Bromphenolblau	0,01 %

2.2.19 Immunoblot/ Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur selektiven antikörpervermittelten Darstellung einzelner Proteine aus einem Proteingemisch. Die Methode des Western Blots gestaltet sich zweischrittig. Im ersten Schritt erfolgt die elektrophoretische Übertragung der in der SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Im zweiten Schritt wird diese mit Antikörpern inkubiert, um schließlich die nachzuweisenden Proteine sichtbar zu machen. Für die Übertragung der Proteine wird das Gel auf eine zuvor mit Methanol aktivierte Nitrozellulose-Membran gelegt.

Das Gel auf der Membran wird zusammen mit Schaumstoff und Filterpapier entsprechend folgender Schichtung in ein Kunststoffmodul für die Laufkammer eingesetzt:

Anodenseite des Kunststoffs
Schaumstoff
Whatman-Pappe
Nitrozellulose-Membran
Proteingel
Whatman-Pappe
Schaumstoff
Kathodenseite des Kunststoffs

Hierbei ist wichtig zu beachten, dass alle Elemente gut durchfeuchtet sind, um Luftblasen zu vermeiden, welche eine Übertragung der Proteine stören würden. Das Gel wird zusammen mit einem Kühlaggregat vertikal in eine Blot-Kammer eingesetzt, in welcher für eine Stunde bei 0,3 A und 80 V die Elektrophorese erfolgt. Anschließend wird das Gel von der Membran entfernt und in eine Coomassie-Färbung eingesetzt. Man trennt von der Membran den Bereich ab, auf den der Marker geblotet wurde, und gibt ihn in ein Amidoschwarzfärbebad (0,8 % w/v in 10 % Essigsäure, 5 % Methanol). Die Anfärbung des Markers ermöglicht eine sofortige Erfolgskontrolle der Proteinübertragung.

Die Membran wird über Nacht bei 4 °C in PBST (0,5 %) mit 20 % FKS inkubiert, um sie gegen eine unspezifische Bindung der später eingesetzten Antikörper abzusättigen. Danach wird die Membran 3 x 10 min mit PBST (0,05 %) unter leichtem Schwenken gewaschen. Die

Membran wird 90 min unter leichtem Schwenken mit der Erstantikörper Verdünnung (1:1000 in PBST) inkubiert und anschließend wie zuvor gewaschen. Als Erstantikörper wurden YadA-spezifische monoklonale (8D1) und polyvalente Antikörper (P1-I und P1:O8) verwendet (1:1000). Bei 8D1 handelt es sich um einen monoklonalen Mausantikörper gegen die AS 290-330 im YadA-Stiel-Bereich, während P1:O8 und P1-I polyvalente Kaninchenantiseren gegen das gesamte YadA_{ent} respektive YadA_{pstb} sind. Danach wird die Membran für 60 min in der Zweitantikörper-Verdünnung (1:2000) unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend wiederum wie zuvor gewaschen. Bei dem Zweitantikörper handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (für polyklonale Erstantikörper) oder Anti-Maus-IgG-Antikörper (für monoklonale Erstantikörper), der mit Peroxidase konjugiert ist (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Der Zweitantikörper bindet an den Fc-Teil des Erstantikörpers, so dass dessen Bindungsort gezielt nachgewiesen werden kann. (Liste der verwendeten Antikörper unter 2.1.7). Um den Blot zu entwickeln, wird das „ECL Western Blotting System“ (GE Healthcare, München), das mit der Peroxidase reagiert, entsprechend Herstellerangaben angewandt. Dann wird ein Röntgenfilm zur Belichtung auf die vorbereiteten Membranen gelegt und folgend entwickelt.

10 x Blotting-Puffer nach Laemmli	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
1 x Blotting-Puffer	10 x Laufpuffer nach Laemmli	100 ml
	Methanol	200 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
10 x PBS, pH 7,4	NaCl, pH 7,4	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄	14,4 g
	KH ₂ PO ₄	2,4 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
PBS-T	1 x PBS	
	Tween 20	0,5 %

Blockierungs-Lösung	fötales Kälberserum (FKS)	2 % in PBS-T
Substratlösung	Diethanolamin, pH 9,6	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Substratgebrauchslösung	Substratlösung	200 ml
	0,9 %-NaCl-Lösung	800 ml
	1 M MgCl ₂ -Lösung	100 µl
NBT-Lösung	Nitroblautetrazoliumchlorid in H ₂ O _{dest.}	1 mg/ml
BCIP-Lösung	5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat in Dimethylformamid	5 mg/ml
Färbelösung	Substratgebrauchslösung	9 ml
	NBT-Lösung	1 ml
	BCIP-Lösung	100 µl

2.2.20 Coomassie-Färbung eines Proteingels

Durch eine Färbung mit Coomassie ist es möglich, alle im Gel enthaltenen Proteine anzufärben und somit darzustellen. Coomassie lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren und färbt dadurch Proteine unspezifisch an. (Weber, *et al.*, 1969)

Hierfür wird das Gel für 30 min in Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wird es etwa eine Stunde, nach Bedarf länger, in Destain-Puffer entfärbt, welcher mehrfach gewechselt wird. Folgend wurden alle Gele fotografiert und später getrocknet, wodurch sie längerfristig aufbewahrt werden können.

Coomassie-Blau-Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue	0,005 %
	Methanol	50 %
	Essigsäure	10 %
	Aqua dest.	40 %
Entfärberlösung (Destain-Puffer)	Methanol	500 ml
	Essigsäure	75 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

2.2.21 IFM (Immunfluoreszenz-Mikroskopie)

Die IFM ermöglicht den mikroskopischen Nachweis von YadA auf der Oberfläche der YadA-klonierten Stämme. Dies gelingt analog zur später beschriebenen immunhistologischen Färbung durch eine Primärinkubation mit einem YadA-spezifischen Antikörper und eine Zweitfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper, der an den Fc-Teil des Erstantikörpers bindet und unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Für diese Methode werden Vorkulturen in 3 ml RPMI-Medium mit Selektionsantibiotikum über Nacht bei 27 °C im Schüttelinkubator angesetzt. Diese werden 1:40 auf Hauptkulturen in 5 ml RPMI-Medium mit Selektionsantibiotikum überimpft, die bei 37 °C über Nacht ebenfalls im Schüttelinkubator angezüchtet werden. Von der Hauptkultur wird 1 ml abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Es wird anschließend in PBS aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Von dieser Verdünnung werden 20 µl auf einen Objektträger gegeben und abgedeckt über 30 min bei RT trocknen gelassen. Auf jede Probe werden 15 µl einer 8D1-Erstantikörperverdünnung (Maus, 1:500) gegeben. Man lässt die Objektträger für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Brutschrank inkubieren. Anschließend werden sie 2 x 5 min mit PBST gewaschen und trocknen gelassen. Dann gibt man auf jede Probe 20 µl einer 1:300-Sekundärantikörperlösung (FITC anti-Maus) und lässt die Objektträger 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren. Danach werden die Proben nochmals 2 x 5 min mit PBST gewaschen und abgedunkelt trocknen gelassen. Anschließend deckt man sie mit Mowiol (Roth, Karlsruhe) und einem Deckglas ein und dichtet die Ränder mit Nagellack ab, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Objektträger können abgedunkelt bei 4 °C bis zur mikroskopischen Auswertung gelagert werden. Die Auswertung dieses Versuchs erfolgte mit dem Olympus Bx61 bei 100-facher Vergrößerung. Hierbei kann unter entsprechender Anregung (495 nm) des fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpers das Signal (521 nm) sichtbar gemacht und fotodokumentiert werden.

2.2.22 Agglutinationstests

Die hier vorgestellten Versuche testen das Agglutinationsverhalten der neu klonierten Stämme und somit auch die Produktion und Funktionalität von YadA.

Die Antikörperagglutination mit weitgehend spezifischen Antikörpern für verschiedene Varianten des YadA testen dessen Oberflächenlokalisation: Ist es auf der Oberfläche

ausreichend vorhanden, agglutinieren die Bakterien bei Zugabe von Anti-YadA-Serum (Sory, *et al.*, 1990). Die Autoagglutination stellt einen durch YadA vermittelten Virulenzmechanismus der Yersinien dar. Die Bakterien können Mikrokolonien im infizierten Gewebe bilden und somit der Wirtsabwehr besser widerstehen. Eine dem Wildtyp vergleichbare Autoagglutination weist auf das funktionsfähige Vorhandensein von YadA hin (Skurnik, *et al.*, 1984).

2.2.22.1 Antikörperagglutination

Für die Testung der Agglutination mit verschiedenen Antiseren wird von diesen eine 1:300-Verdünnung in PBS angesetzt. Von den zu testenden Bakterien wird zuvor erst eine Vorkultur auf Selektionsagar über Nacht bei 27 °C angezüchtet und am folgenden Tag eine Hauptkultur wiederum auf Selektionsagar bei 37 °C über Nacht angesetzt. Von der verdünnten Antikörper-Lösung wird ein Tropfen von etwa 15 µl auf einen Glasobjektträger gegeben. Mit einer Impföse wird eine kleine Menge der Hauptkultur abgenommen und in diesen Tropfen eingegeben. Danach wird der Objektträger etwas geschwenkt und im Verlauf über 5 min auf Ausflockung oder Schollenbildung beobachtet. Das Ergebnis dieses Versuchs wird als Positiv- bzw. Negativ-Ergebnis der als Ausflockung sichtbaren Agglutination protokolliert.

Dieser Versuch wurde in dieser Arbeit mit weitgehend speziesspezifischen Anti-YadA-Antikörpern/-seren durchgeführt. Hierbei wurde zum einen der polyklonale Antikörper P1-O8 verwendet, der gegen *Y. enterocolitica* Serotyp O8 gerichtet ist, und der polyklonale Antikörper PI-1, der gegen *Y. pseudotuberculosis* Serotyp I gerichtet ist.

2.2.22.2 Autoagglutination

Für diese Methode werden von den zu untersuchenden Bakterien Vorkulturen in 5 ml RPMI-Medium mit Selektionsantibiotikum über Nacht bei 27 °C im Schüttelinkubator angesetzt. Diese werden auf Hauptkulturen in 5 ml RPMI-Medium mit Selektionsantibiotikum überimpft, wobei eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt wird, und diese bei 37 °C über 7 Stunden im Brutschrank (ohne Schütteln) inkubiert (Skurnik, *et al.*, 1984). Hierbei ist wichtig zu beachten, dass die Hauptkulturen in Glasröhrchen angesetzt werden, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch eine Agglutination an Plastik auszuschließen.

Anschließend werden die Proben bewertet und beschrieben. Hierbei wird darauf geachtet, wie sich die Bakterien in dem Medium verhalten, ob das Medium klar ist und sich ein

Niederschlag gebildet hat oder die Bakterien in Suspension verbleiben (planktonisch) oder an der Reagenzglasscheibe haften. Anschließend werden sie aufgeschüttelt und die Agglutinate beschrieben. Hierbei wird darauf geachtet, ob der Niederschlag leicht im Medium resuspendiert oder ob er flockt bzw. zähe Schlieren zieht. Letzteres, Flocken oder Schlieren bei zuvor klarem Medium mit deutlichem Bodensatz, wird als Resultat der Autoagglutination verstanden und als solche protokolliert.

2.2.23 ELISA zum Nachweis der Kollagen- und Fibronectin-Bindung der YadA-positiven Yersinien

Der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymvermittelten Farbreaktion basiert. Hierbei sind entweder Antikörper oder Antigen mit einem Enzym gekoppelt. Dieses vermittelt einen Farbumschlag, der die Bindung von Antikörper an Antigen sichtbar macht. Nach Inkubation von Antigen mit Antikörper und folgenden Waschschritten wird ein Substrat zugesetzt, welches unter Anwesenheit des Enzyms derart umgesetzt wird, dass es zu einem Farbumschlag kommt. Die Signalstärke ist im Allgemeinen von der Antikörper-Antigenkonzentration abhängig, so dass ein ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

In dieser Arbeit wurde eine ELISA-Variante mit zwei Antikörpern angewandt. Bei dem ersten Antikörper handelt es sich um ein Kaninchen-Anti-Yersinien-Antiserum (WAVital), bei dem zweiten um einen enzymgekoppelten Antikörper, der spezifisch für diesen Erstantikörper ist (Peroxidase-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper). Wird der Test positiv bedeutet dies, dass einerseits der Anti-Yersinien-Antikörper an den Bakterien haftet, und andererseits die Yersinien trotz der wiederholten Waschvorgänge an z.B. mit Kollagen oder Fibronectin beschichteten Multi-Well-Platten adhären. Somit markiert dieses Verfahren nur Yersinien, die eine Adhäsionsfähigkeit an Kollagen oder Fibronectin besitzen.

Zunächst wird eine Vorkultur (12h / 27°C) der zu untersuchenden Bakterien in je 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum angesetzt. Die Hauptkultur wird mit 1/40-stel der Vorkultur beimpft (5 ml NB-Medium) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wird eine Verdünnung der zu untersuchenden EZM-Proteine in PBS angesetzt: Fibronectin 0,1 µg/ml, Kollagen I 0,4 µg/ml. Hiervon werden 50 µl je Napf auf eine 96-Well Platte (Typ Microlon 600, Greiner, Frickenhausen) aufgetragen. Diese wird abgedeckt bei 4 °C über Nacht inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dienen unbeschichtete Näpfe. Die Flüssigkeit wird dann

entfernt und 250 µl PBST mit 5 % Albumin pro Napf aufgegeben. Dies wird eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt dient der Absättigung des EZM-Proteins, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Zwischenzeitig wird die OD₆₀₀ der Hauptkulturen bestimmt und für ein Volumen von 2 ml auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt. Die Bakterien werden einmal in PBS gewaschen und wiederum in 2 ml PBS aufgenommen. Die Näpfe werden 5 x mit PBST (1 %) gewaschen.

Es werden 50 µl der Proben je Napf aufgebracht und die Platte abgedeckt eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Näpfe werden 5 x mit PBST (1 %) gewaschen. Es werden je Napf 100 µl der Erstantikörperverdünnung (WAVital, 1:10 000 in PBS) aufgebracht, die Platte abgedeckt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Näpfe werden 5 x mit PBST (1 %) gewaschen. Es werden je Napf 100 µl der Zweitantikörperverdünnung (Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, 1:5000 in PBS) zugegeben und die Platte bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Die Näpfe werden 5 x mit PBST (1 %) gewaschen. Es werden je Napf 100 µl Entwicklerlösung (12 ml Substratpuffer + 5 µl H₂O₂ + 8 mg o-Phenylendiamin) zugegeben und die Platte abgedunkelt bei RT für 15 min bis zur Gelbfärbung der Lösung inkubiert. Es werden je Napf 100 µl Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄) zugegeben und die Platte weiter abgedunkelt für 5 – 30 min inkubiert. Anschließend wird die Platte mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 491 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm ausgewertet.

Substratpuffer 0,1 M pH 5,0	Zitronensäure	0,034 M
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,066 M
Schwefelsäure 0,5 M	95 % Schwefelsäure	2,8 ml
	H ₂ O _{dest.}	90 ml
1 M Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	84,01 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
PBS-5 mM MgCl ₂ -Puffer	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	MgCl ₂	5 mM

2.2.25 Methoden zur Arbeit mit Zellkulturen

2.2.25.1 Kultivierung von HeLa-Zellen für das Invasions- und Adhärenz-Assay

Bei der Arbeit in der Zellkultur ist größte Sorgfalt auf steriles Arbeiten zu legen, um eine mikrobielle Kontamination der Zellen zu vermeiden. Aus diesem Grund erfolgen alle Arbeiten unter der Sterilbank, alle verwendeten Materialien und Lösungen werden entweder steril vom Hersteller bezogen oder steril-filtriert.

Die HeLa-Zellen werden in 175 cm² Zellkulturflaschen (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in 15 ml RPMI-Medium kultiviert. Dem Medium wird zuvor 10 % FKS zugegeben.

Für HeLa-Zell-Yersinien-Adhärenzversuche wurden semi-konfluierende Zellkulturen verwendet. Hierfür wird eine konfluent gewachsene Kultur mit 10 ml PBS gewaschen und nachfolgend wird 1 ml einer 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin bewirkt, dass sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen ablösen, zusätzlich können die Zellen nach der Inkubation noch durch vorsichtiges Klopfen gegen den Flaschenboden gelöst werden. Dann werden 9 ml RPMI zugegeben, wodurch das Trypsin inaktiviert wird. Die Zellen werden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 10 ml frisches RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellzahl in der Suspension wird mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für den Invasions- oder Adhärenz-Teste werden die Zellen über Nacht in einer 24-Well-Platte kultiviert, wobei pro Napf 1 x 10⁵ Zellen ausgesät werden. Zur weiteren Kultivierung werden die Zellen etwa 1:5 in verdünnt und auf frische Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.25.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellkonzentrationen erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Durchlichtmikroskop. Hierfür werden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und die Anzahl der Zellen pro Quadrat ausgezählt. Es werden grundsätzlich alle vier Quadrate ausgezählt und der Mittelwert ermittelt.

Die Zellkonzentration wurde nach folgender Formel errechnet:

Ausgezählte Zellzahl pro Quadrat x 10⁵ = Anzahl der Zellen/ml

2.2.25.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

HeLa-Zellen können in flüssigem Stickstoff gelagert über viele Jahre konserviert werden. Zur Konservierung werden konfluent gewachsene Zellrasen durch Trypsin-Behandlung abgelöst und gewaschen und in einer Konzentration von 5×10^5 in 1 ml Zell-Einfriermedium in Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) eingefroren. Hierfür wurden die Kryoröhrchen erst für 24 h in einen mit Isopropanol befüllten bei -80 °C gelagerten Behälter verbracht. Dieser Schritt dient einer kontrollierten Temperaturminderung von 1 °C/min . Anschließend wurden die Röhrchen in einen Stickstofftank transferiert.

Da das im Zell-Einfriermedium enthaltene DMSO außerhalb der Kryokonservierung zellschädigend ist, muss es während des Auftauprozesses schnellst möglich entfernt werden, andernfalls könnte verbleibendes DMSO zur Inaktivierung der Zellen führen. Den aufzutauenden Zellen wird sofort nach Entnahme aus dem Stickstofftank 10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium zugegeben, um das DMSO zu verdünnen. Danach werden die Zellen dreimal mit etwa 10 ml Zellkulturmedium bei $500 \times g$ gewaschen. Anschließend werden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und wie beschrieben (2.2.25.1) kultiviert.

2.2.26 Adhärenz-Assay an HeLa-Zellen

Dieser Versuch entspricht dem ersten Schritt des folgend beschriebenen Gentamicin-protection-Assays dar (siehe 2.2.26). Hier lässt sich die Adhärenzrate der eingesetzten Bakterien an HeLa-Zellen bestimmen. Die Versuchsschritte gleichen denen des Gentamicin-protection-Assays mit Ausnahme der Zugabe von Gentamicin. Dies wird hier unterlassen, somit ermittelt man hier die Anzahl der invadierten und der adhärenen Yersinien. Die verschiedenen Inkubations- und Waschschrte werden bewusst analog zum Gentamicin-protection-Assay durchgeführt, um ein Bakterienwachstum während des Versuchs auszugleichen und so eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen:

- Nach Erreichen einer OD von 0,3 wird die Bakteriensuspension angesetzt
- Abnehmen des Mediums und Beschicken der Nöpfe $500\text{ }\mu\text{l}$ der Bakteriensuspension
- Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm
- Inkubation für 30 min bei 37 °C
- 3 x mit je $500\text{ }\mu\text{l}$ sterilem PBS waschen
- Inkubation für 90 min bei 37 °C
- 3 x mit je $500\text{ }\mu\text{l}$ sterilem PBS waschen

- Lyse der Zellkultur mit 200 µl PBS mit 1 % Triton
- Zugabe von 800 µl LB-Medium
- Erstellen einer Verdünnungsreihe und Ausplattieren von 100 µl der 10^{-1} - bis 10^{-3} -Verdünnungsstufen auf Selektionsagar
- Inkubation über zwei Tage bei 27 °C, anschließend Auszählen.

Mit den verbleibenden 500 µl der Ausgangssuspension wird eine Keimzahlkontrollbestimmung vorgenommen. (Ausgangspunkt: multiplicity of infection, MOI)

2.2.27 Gentamicin-protection-Assay / Invasions-Assay für HeLa-Zellen

Dieser Versuch stellt eine Methode dar, mit welcher die Invasionsrate der eingesetzten Yersinien in HeLa-Zellen bestimmt werden kann.

Für diesen Versuch werden am Vortag $1,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen pro Napf auf einer 24-Well-Platte (Greiner, Frickenhausen) ausgesät, wobei durch Mikroskop-Kontrolle auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen geachtet wird. Die so vorbereitete 24-Well-Platte wird für 24 Stunden im Zellkultur-Inkubator ruhen gelassen, so dass die Zellen an den Boden der Näpfe adhären. Zu Versuchsbeginn, 24 Stunden später, hat sich die Anzahl der eingesetzten Zellen erfahrungsgemäß verdoppelt. Ebenso wird am Vortag eine Vorkultur der zu untersuchenden Bakterienstämme in jeweils 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum angesetzt und bei 27 °C über 12 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert. Mit dieser Vorkultur wird entsprechend später eine Hauptkultur im Verhältnis 1:40 beimpft. Diese Hauptkultur wird jeweils in 5 ml RPMI-Medium mit Selektionsantibiotikum angeimpft und für 3 – 4 Stunden bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,3 bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Eine OD_{600} von 0,3 entspricht einer Konzentration von 5×10^7 Bakterien pro ml. In diesem Versuch wird eine MOI 50 eingesetzt, was bedeutet, dass 50 Bakterien pro HeLa-Zelle eingesetzt werden. (MOI = Multiplicity of infection, Verhältnis der Anzahl der Bakterien zur Anzahl der eukaryotischen Zellen).

Nach Erreichen der OD_{600} wird jeweils ein Volumen von 960 µl entsprechend $4 \times 1,2 \times 10^7$ Bakterien abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml RPMI-Medium aufgenommen. Das Medium in den Näpfen wird mit einer Pipette durch 500 µl Bakteriensuspension pro Napf ausgetauscht. Hierbei werden jeweils drei Näpfe mit derselben Suspension beschickt, um später einen Mittelwert bilden zu können. Die 24-Well-Platten werden für 10 min bei

1000 rpm zentrifugiert, um die Bakterien mit den Zellen synchron in Kontakt zu bringen. Die Platten werden für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, in dieser Zeit kann eine potenzielle Invasion erfolgen. Die Näpfe werden anschließend 3 x mit je 500 µl sterilem PBS gewaschen. Je Napf werden 500 µl steriles PBS mit 50 µg/ml Gentamicin zugegeben. Die Platten werden 90 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um alle extrazellulären Bakterien abzutöten. Die Näpfe werden 3 x mit je 500 µl sterilem PBS gewaschen, um das Gentamicin zu entfernen. Pro Napf werden 200 µl PBS mit 1 % Triton-x-100 zu gegeben und durch mehrfaches Resuspendieren HeLa-Zellen lysiert. Es werden pro Napf 800 µl LB-Medium zugefügt. Hiervon wird eine Verdünnungsreihe erstellt und jeweils 100 µl der 10⁻¹ bis 10⁻³-Verdünnungsstufen auf Selektionsagar ausplattiert. Diese Agarplatten werden über zwei Tage bei 27 °C inkubiert und folgend ausgezählt. Den pro Stamm verbleibenden 500 µl der Infektionssuspension werden 500 µl PBS zugefügt und hieraus eine Verdünnungsreihe erstellt, von der jeweils 100 µl der 10⁻⁴ bis 10⁻⁶-Verdünnungsstufen auf Selektionsagar ausplattiert und über zwei Tage bei 27 °C inkubiert wurden. So lässt sich durch eine Keimzahlrückbestimmung die MOI der eingesetzten Bakterien kontrollieren.

2.2.28 Mausinfektionsversuche

Für die Tierversuche wurden ausschließlich 6 bis 8 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse verwendet (Janvier Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich). Die Mäuse wurden in Gruppen von fünf Tieren in individuell belüfteten Käfigen (Tecniplast, Buguggiate, Italien) im Tierstall des Max von Pettenkofer-Institut gehalten. Tierversuche wurden gemäß der geltenden Rechtsgrundlage (Tierversuchsantrag: Az. 55.2-1-54-2531-153/07) durchgeführt.

2.2.28.1 Keimpassage

Bei fehlendem Selektionsdruck (z. B. Immunabwehr) führt die in vitro Anzucht zur Abschwächung der Mausvirulenz. Deshalb werden Yersinien vor einem Infektionsversuch Maus-passagiert, um so eine hinsichtlich der Virulenz homogene Population zu selektionieren.

Hierfür wird eine Kultur in 3 ml LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum, mit einer Einzelkolonie des zu passagierenden Stammes beimpft und bei 27 °C über Nacht inkubiert. Hiervon wird 1 ml 5 min bei 10000 x g abzentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Zur Passage werden einer Maus 30 µl des Resuspendats intraperitoneal injiziert. Nach 18 bis 24

Stunden erfolgt die Tötung gemäß Tierschutzbestimmungen mit CO₂. Die Maus wird äußerlich mit Isopropanol desinfiziert und danach der Bauchraum eröffnet. Hierbei ist darauf zu achten, dass das Peritoneum nicht verletzt wird. Mit einer feinen Nadel werden 5 ml PBS intraperitoneal injiziert, ohne den Darm zu verletzen. Das gespannte Peritoneum wird vorsichtig angestoßen, um die Bakterien aus dem Intraperitonealraum zu waschen, und das PBS vorsichtig wieder abgezogen. Diese Suspension wird auf Eis ins Labor überführt. Im Labor werden von der Suspension 300 µl auf einer CIN-Agar-Platte ausplattiert und auf einer zweiten ein 3-Ösen-Ausstrich angefertigt. Diese Platten werden für zwei Tage bei 27 °C inkubiert. Folgend wird eine 120 ml-Kultur in LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 27 °C über Nacht inkubiert. Diese wird abzentrifugiert (2 min, 10000 x g) und in 10 ml Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

Frühestens zwei Tage später werden wenigstens drei der eingefrorenen Proben wieder aufgetaut und von diesen eine achtstufige Verdünnungsreihe in PBS angefertigt. Von den Verdünnungsstufen 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ werden je 100 µl auf CIN-Agar ausplattiert und über zwei Tage bei 27 °C inkubiert. Die Platten werden ausgezählt und mit den Ergebnissen die durchschnittliche Bakterienkonzentration in den Aliquots berechnet.

2.2.28.2 Oralinfektionsversuche

Für die Oralinfektion der Mäuse ist eine 8-stündige Nüchtern-Phase der Tiere auf Gitter wichtig, um die perorale Aufnahme der Keime in Flüssigkeit zu verbessern und um Koprophagie zu vermeiden.

Zur Vorbereitung der Infektionslösung wird von dem auf Eis aufgetauten Aliquot passagierter Keime ein Volumen entsprechend 5 x 10⁹ Bakterien entnommen und abzentrifugiert (2 min, 10000 x g, 4 °C) und in 60 µl PBS aufgenommen. Von dieser Infektionslösung werden den Versuchstieren je 12 µl mittels einer Pipette oral appliziert, was einer Infektionsdosis von 10⁹ Keimen pro Tier entspricht. Die Tiere erhalten direkt im Anschluss an die Infektion Wasser und Futter ad libitum. Die infizierten Mäuse werden für fünf Tage weiter auf Gitter gehalten. Pro Versuchsansatz wurden fünf Tiere infiziert. Von dem Aliquot, mit dem die Tiere infiziert werden, wird zudem zur Keimzahlrückbestimmung eine siebenstufige Verdünnungsreihe angefertigt, von der je 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁻⁴ bis 10⁻⁷ auf CIN-Agar-Platten ausplattiert und bei 27 °C für 2 Tage inkubiert werden.

Am fünften Tag werden die Tiere nacheinander mit CO₂ getötet (siehe 2.2.27.3), mit Isopropanol desinfiziert und die Organe entnommen. Nach vorsichtiger Eröffnung der

Schädelhälften wird das Gehirn am Stück entnommen. Brust- und Bauchraum werden vorsichtig mit einer Schere eröffnet, um keine inneren Organe zu verletzen. Dann werden nacheinander Lunge, Milz, Leber und Darm entnommen. Der Darm wird mit 5 ml PBS gespült, der Darminhalt gesammelt, in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen (Bio-Rad, München) gefüllt und auf Eis gekühlt. Am Darm selbst werden die Peyerschen Plaques exzidiert. Ein entzündetes Peyersches Plaque, jeweils eine Hälfte von Gehirn und Lunge und ein Drittel von Milz und Leber werden in Tissue Tek® (Sakura Finetek, Torrance) eingebettet und auf Trockeneis schock-gefroren, später bei -80 °C gelagert. Später werden diese Präparate zur Herstellung der Gewebsschnitte genutzt. Die übrigen Gewebsanteile werden wie folgt in 2 ml-Eppendorf-Gefäße mit PBS und Metallkügelchen (neolab, Heidelberg) gegeben. Die Metallkügelchen dienen der späteren Homogenisierung der Gewebe.

Milz	1 ml PBS	1 Metallkügelchen
Peyersche Plaques	1 ml PBS	2 Metallkügelchen
Leber	750 µl PBS	1 Metallkügelchen
Lunge	750 µl PBS	1 Metallkügelchen
Gehirn	750 µl PBS	1 Metallkügelchen

Die Proben werden bis zur weiteren Verarbeitung im Labor auf Eis gelagert, danach gewogen und homogenisiert. Von dem homogenisierten Material und dem Darminhalt werden vierstufige Verdünnungsreihen angefertigt und die Verdünnungsstufen 10^0 , 10^{-2} und 10^{-4} auf CIN-Agar-Platten ausplattiert und die Platten bei 27 °C für 2 Tage inkubiert. Folgend werden die Platten ausgezählt und mit den Ergebnissen die Keimzahl in den Geweben berechnet.

2.2.29 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Gewebsschnitte der entnommenen Organe werden mit dem Kryomikrotom Leica CM 1950 angefertigt. Sie haben eine Schichtdicke von 10 µm. Der Objekthalter hat während des Schneidens eine Temperatur von -21 °C, die Kammer eine Temperatur von -19 °C. Die Gewebsschnitte wurden auf Objektträger der Sorte Superfrost Scientific (Menzel, Braunschweig) aufgenommen, in geeignete Boxen eingesetzt und diese in luftdicht verschließbare Plastikbeutel verpackt und bei -20 °C gelagert.

2.2.30 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), die aus zwei Einzelfärbungen besteht, können verschiedene Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden. Die HE-Färbung ist eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbemethoden für morphologische Untersuchungen. Hämaun färbt alle sauren beziehungsweise basophilen Strukturen blau. Besonders stark werden somit Zellkerne mit der darin enthaltenen DNS und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum angefärbt. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt alle basischen (eosinophilen) Strukturen rot. Dies sind vor allem die Zellplasmae.

Durch den niedrigen pH-Wert der Färbelösung erscheinen die Zellkerne nach Färbung mit Hämaun zunächst rötlich-braun. Zum Farbumschlag in das typische Blauviolett kommt es durch Spülen mit Leitungswasser und der damit verbundenen Erhöhung des pH-Wertes, was man als Bläuen bezeichnet. Es folgt eine alkoholische Reihe, eine Spülung der Schnitte in wässrigen Alkohollösungen aufsteigender Konzentration, durch die das Wasser aus den Gewebsschnitten verdrängt wird. Anschließend wird der Schnitt in einer alkoholischen Eosin-Lösung gefärbt und danach in absolutem Alkohol geklärt. Man lässt den Schnitt für kurze Zeit trocknen und deckt ihn dann mit einem Eindeckmittel und Deckglas ein. Schnitt und Färbung bleiben so für Jahrzehnte erhalten und mikroskopierbar, sollten aber dunkel gelagert werden, damit die Färbung nicht ausbleicht.

Hämaun: 1:5 Verdünnung von Mayers Hämaun (Merck)

Eosin: Ethanol mit 0,5 % Eosin Y

Differenzierbad: Ethanol, 1 % HCl

Glyceringelatine (Merck)

Im Verlauf der Versuche hat sich hierbei folgendes Protokoll bewährt:

- Die bei -20 °C gelagerten Objektträger werden bei RT etwa 20 min aufgetaut, hierbei ist es wichtig, sie erst aus der luftdicht verschlossenen Aufbewahrung zu entnehmen, wenn sie vollständig aufgetaut sind.
- Objektträger für 5 min auf der Wärmeplatte bei einer Temperatur von etwa 50 °C trocknen
- 5 min in eiskaltem Aceton fixieren, anschließend trocknen lassen
- 2 min in Aqua_{dest} spülen

- 10 min in Hämalun färben
- abspülen in Leitungswasser
- kurz (!) (max. 2 sek) differenzieren in Ethanol, 1 % HCl
- 5 min bläuen in warmem Leitungswasser
- entwässern mit alkoholischer Reihe (50 %, 70 %, 90 %, 95 %), je 2 min pro Schritt
- 4 min in alkoholischem Eosin färben
- in Ethanol (95 %) abspülen
- ca. 10 min trocknen lassen
- mit Glyceringelatine und Deckglas eindecken

2.2.31 Immunfluoreszenzfärbung (indirekte Methode)

Als Immunhistochemie bezeichnet man eine Methode, mit der Proteine / Antigene mit Hilfe von spezifischen Enzym- oder Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Hierdurch kann bestimmt werden, in welchem Gewebe und welchem Zellkompartiment ein gesuchtes Antigen lokalisiert ist. Diese Antikörperfärbungen werden von fixierten Gewebeschnitten erstellt. Außerdem ist es möglich, Zellen aus Suspendaten mittels Zentrifugation auf Objektträger aufzubringen und immunzytochemisch zu untersuchen. Bei der als indirekte Immunfluoreszenz bezeichneten Methode wird zuerst ein Primärantikörper auf das zu untersuchende Gewebe bzw. die zu untersuchenden Zellen aufgebracht. Dieser ist für das zu detektierende Epitop spezifisch. Folgend wird ein Sekundärantikörper aufgetragen, der sich gegen den Primärantikörper richtet. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Das Färbergebnis kann durch Fixierungsart, Fixierungsdauer, Einbettungsmethoden, Vorbehandlungsmethoden (Antigen-Retrieval) der Präparate, etc. beeinflusst werden. Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist abhängig von Temperatur, Konzentration, Inkubationszeit, Agitation und dem optimalen Reaktionsmilieu (pH-Wert, Salzkonzentrationen). Deswegen ist ein standardisierter Ablauf der Färbung entscheidend. Folgendes Protokoll hat sich für die Färbung der auf Objektträger aufgetragenen Kryo-Gewebsschnitte bewährt:

Fixierung:

Die bei -20 °C gelagerten Objektträger werden wie in 2.2.30 beschrieben entnommen und getrocknet. Danach folgt die 10-minütige Fixierung in 3,8 %-igem Paraformaldehyd.

Färbung:

Die fixierten Schnitte werden mit etwas PBST betropft und so in Färbeschienen eingesetzt, dass ein durchgehender Flüssigkeitsfilm Objektträger und Schiene verbindet. Der durchgehende Flüssigkeitsfilm ist wichtig, da alle unbedeckten Stellen im weiteren Verlauf nicht von den Antikörperlösungen erreicht und so nicht gefärbt werden. Anschließend werden die Schnitte für 2 x 5 min mit PBST bei RT rehydriert.

Die Schnitte werden 2 x 10 min bei RT mit 5 % Ziegsenserum (ZS) in PBST (150 µl pro Objektträger) inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verringern. Die Erstantikörperverdünnung wird in PBST mit 2,5 % ZS angesetzt, kurz gevortext, 150 µl pro Objektträger aufgegeben und eine Stunde bei RT inkubiert (Verdünnungsfaktor siehe 2.1.7). Es folgen vier Waschschrte, 2 x mit PBST mit 1 % FKS, 2 x mit PBST. Dafür werden die Färbeschienen vollständig mit Waschpuffer gefüllt und gewartet, bis der Puffer durchgelaufen ist, um sie dann erneut zu füllen. Die Zweitantikörperverdünnung wird in PBST mit 2,5 % ZS angesetzt, 150 µl pro Objektträger aufgebracht und 45 min bei RT inkubiert. Danach folgen erneut vier Waschschrte. Für die DAPI-Färbung wird DAPI 1:1000 in PBST angesetzt (Invitrogen, Karlsruhe; Stock-Lsg.: 1mg/ml). Sie erfolgt in zwei 2-minütigen Inkubationsschritten bei RT (150 µl pro Objektträger). DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNS anlagert und genutzt wird, um Zellkerne darzustellen. Danach folgen zwei Waschschrte mit PBST. Danach entnimmt man die Objektträger vorsichtig aus den Färbeschienen und lässt sie kurz ablaufen, danach werden sie luftblasenfrei mit Mowiol (Roth, Karlsruhe) und einem Deckglas eingedeckt. Die Objektträger werden lichtgeschützt und kühl (4°C) gelagert.

Mowiol-Lösung	Mowiol	20 g
	PBS	80 ml
	Glycerin	40 ml

2.2.32 Mikroskopie

2.2.32.1 Durchlichtmikroskopie

Die Begutachtung und Aufnahme der HE-gefärbten Gewebeschnitte erfolgte mittels Durchlichtmikroskopie mit dem Axivert 25 (Zeiss, Jena). Die Fotodokumentation erfolgte unter 20-facher Vergrößerung. Die Daten wurden als jpg-Dateien gespeichert.

2.2.32.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Begutachtung und Aufnahme der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie mit dem Olympus Bx61 und dem Programm Cell P (Olympus, Tokyo). Die Farbdarstellung und Überlagerung der Aufnahmen erfolgte ebenfalls mit diesem Programm. Die Fotodokumentation erfolgte für die Gewebeschnitte unter 10-facher Vergrößerung, um Gesamtaufnahmen eines Gewebeschnitts zu erhalten. Die Aufnahmen der Zell- und Bakterien-Präparate erfolgten unter 40-facher Vergrößerung. Die Daten wurden als jpg- und tif-Dateien gespeichert.

2.2.33 Statistische Auswertung

Invasions- und Adhärenz-Versuche mit eukaryotischen Zellen wurden mindestens dreimal in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. ELISA-Experimente wurden in drei unabhängigen Abläufen durchgeführt. Tierversuche wurden mit einer Anzahl von fünf Versuchstieren pro Versuchsgruppe durchgeführt. Von den Ergebnissen der ELISA-Experimente und der Zellversuche wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt und in Diagrammen dargestellt und sie wurden mittels Student's t-Test auf Signifikanz überprüft (GraphPad Software, 2002-2005). Signifikanz-Werte von $(p) \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen. Die Ergebnisse der Tierversuche wurden in Diagrammen dargestellt und mittels des Mann-Whitney-U-Tests auf Signifikanz überprüft (Avery, 2007). Signifikanz-Werte von $(p) \leq 0,01$ wurden als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der YadA-Hybride auf der Oberfläche der Außenmembran von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*

Um die Expression der verschiedenen YadA-Hybride auf der Außenmembran von *Y. enterocolitica* WA-314 nachzuweisen, wurden einerseits Außenmembranpräparationen der Mutanten erstellt, andererseits Immunfluoreszenztests und Agglutinationsversuche durchgeführt. Ebenso wurden letztere Versuche und ein Westernblot bakterieller Gesamtzelllysate zum Nachweis der *yadA*-Deletion in den Deletionsmutanten von *Y. pseudotuberculosis* YPIII und IP32953 im Vergleich mit den Wildtyp-Stämmen durchgeführt.

3.1.1 Nachweis von YadA in der Außenmembranpräparation

Um die Expression der verschiedenen YadA-Hybride und deren Exposition auf der Außenmembran in *Y. enterocolitica* O8 und *Y. pseudotuberculosis* YPIII nachzuweisen, wurden deren Außenmembranpräparationen im Westernblot dargestellt (Abb.8). Es wurden im Vergleich Westernblots mit verschiedenen Antikörpern / Antiseren angefertigt: den Kaninchen-Antiseren P1:O8 und P1-I und dem monoklonalen Antikörper 8D1, welche für verschiedene Regionen des YadA spezifisch sind. Diese Antikörper wurden unter der Annahme verwendet, das P1:O8 höher spezifisch ist für YadA_{ent} (Ackermann, 2005) und P1-I höher spezifisch für YadA_{pstb}, während 8D1 keine unterschiedliche Spezifität für die verschiedenen YadA hat. 8D1 bindet im *stalk*-Bereich an Aminosäuren 290 bis 330, dies ist ein hochkonservierter Bereich und bei allen hier betrachteten Mutanten identisch (Roggenkamp, *et al.*, 2003). In all diesen Blots zeigte sich, dass alle Konstrukte vergleichbar stark auf der Außenmembran exprimiert werden.

3.1.2 Immunoblot-Überprüfung der *yadA*-Gendeletion von *Y. pseudotuberculosis*

Um den Nachweis der erfolgreichen Deletion des Gens in den *Y. pseudotuberculosis* *yadA*-Deletionsmutanten pYV32953::kan Δ *yadA* in IP-C und pIB1::kan Δ *yadA* in YPIII-C zu erbringen, wurden Westernblots von bakteriellen Gesamtzelllysaten beider Stämme im

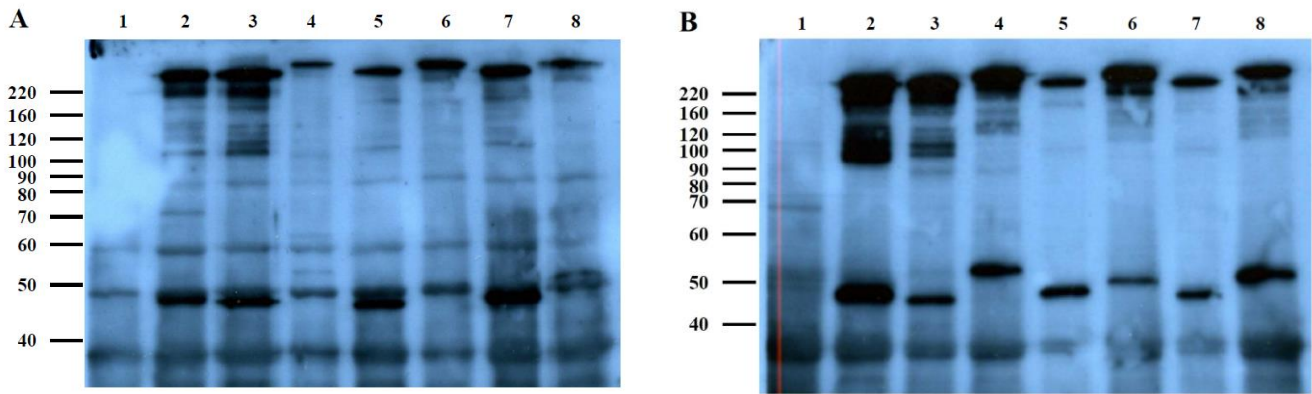


Abb.8: Westernblots der Außenmembranpräparationen

Zur Präparation der Außenmembran wurden alle Stämme für 6 h bei 37°C angezüchtet und je 10 µg von jedem Ansatz für 2 h bei 37°C in Probenpuffer solubiert.

Blot A-C: Erstantikörper: polyklonaler P1:O8 1:1000; Zweitantikörper: Peroxidase conj. Goat-Anti-Rabbit-IgG 1:5000; Molekulargewicht der Markerproteine in kDa. (N = Negativkontrolle, P = Positivkontrolle)

Blot A:

1	WA-C (pYV-AS) (N)
2	WA-C (pYV-A1) (P)
3	WA-C (pYV-AS-8)
4	WA-C (pYV-AS-3)
5	WA-C (pYV-AS-I)
6	WA-C (pYV-ASS-I)
7	WA-C (pYV-AS-III)
8	WA-C (pYV-ASS-III)

Blot B:

1	WA-CΔinv (pAC-F) (N)
2	WA-CΔinv (pAC-F-A1) (P)
3	WA-CΔinv (pAC-F-AS-8)
4	WA-CΔinv (pAC-F-AS-3)
5	WA-CΔinv (pAC-F-AS-I)
6	WA-CΔinv (pAC-F-ASS-I)
7	WA-CΔinv (pAC-F-AS-III)
8	WA-CΔinv (pAC-D-ASS-III)

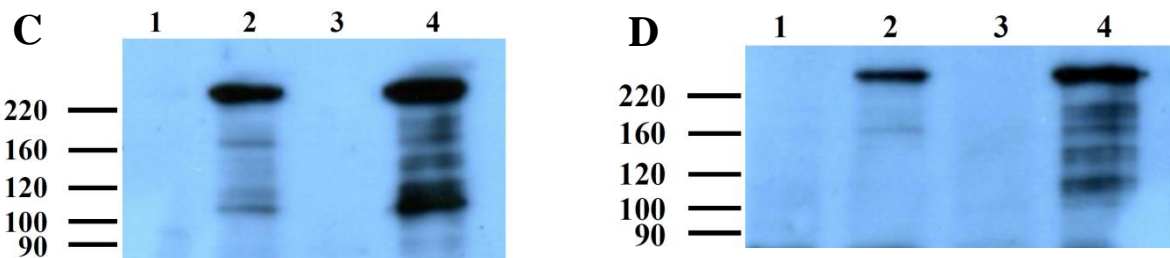


Abb.9: Westernblots bakterieller Gesamtzelllysate

Vor dem Auftragen auf das Proteingel wurden alle Gesamtzelllysate 5 min bei 100°C erhitzt; Erstantikörper (1.AK): Blot D: polyklonaler P1-I 1:1000, Blot E: monoklonaler 8D1 1:1000; Zweitantikörper: Blot D: Peroxidase conj. Goat-Anti-Rabbit-IgG 1:5000, Blot E: Peroxidase conj. Goat-Anti-Mouse-IgG 1:5000; Molekulargewicht der Markerproteine in kDa.

Blot C:	1	IP-C (pYV32953::kanΔyadA)	Blot D:	1	IP-C (pYV32953::kanΔyadA)
1.AK: P1-I	2	IP32953 (Wildtyp)	1.AK: 8D1	2	IP32953 (Wildtyp)
	3	YPIII-C (pIB1::kanΔyadA)		3	YPIII-C (pIB1::kanΔyadA)
	4	YPIII (Wildtyp)		4	YPIII (Wildtyp)

mit dem Wildtyp *Y. pseudotuberculosis* IP32953 und YPIII angefertigt. Hiervon wurden zum einen YadA mit dem polyklonalen Erstantikörper P1-I dargestellt zum anderen mit dem monoklonalen Erstantikörper 8D1 (Abb.9). Für beide *Y. pseudotuberculosis* Stämme zeigten sich deutliche YadA-Monomere und -Polymere Banden und ein fehlendes YadA in den Deletionsmutanten.

3.1.3 Agglutinationsversuche und Immunfluoreszenztest

Tabelle 3 zeigt das Verhalten der Yersinien mit ihren unterschiedlichen YadA-Hybriden im Antikörper-Agglutinationsversuch, im Autoagglutinationstest und in der Immunfluoreszenz.

Die Agglutination der Bakterien, als Autoagglutination oder als Agglutination mit einem Antikörper (P1:O8, P1-I), ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von YadA auf der Bakterienoberfläche. Mit Ausnahme der Negativkontrolle (pYV-AS) und der *yadA*-negativen Stämme (pAC-F, IP-C (pYV32953::kanΔ*yadA*), YPIII-C (pIB1::kanΔ*yadA*)) zeigten alle Stämme eine vergleichbar ausgeprägte Autoagglutination. In der Agglutination mit dem Antikörper P1:O8 zeigte sich, dass die Bakterien, die ein YadA_{ent} exprimierten, stärker agglutinierten, als die Bakterien, welche ein YadA_{pstb} exprimierten. Umgekehrt agglutinierten letztere stärker mit dem Antikörper P1-I. Dieses Agglutinationsverhalten entspricht der zu erwartenden, höheren Avidität von P1:O8 für YadA_{ent} und der höheren Avidität von P1-I für YadA_{pstb}.

Gestützt wurde die Feststellung der korrekten Oberflächenexposition der Konstrukte durch die Durchführung eines Immunfluoreszenztests der unfixierten Yersinien mit dem monoklonalen Antikörper 8D1. So war deutlich zu erkennen, dass alle YadA-Varianten und YadA-Hybride auf der Oberfläche nachweisbar sind. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz bestätigten somit die Ergebnisse der Agglutinationsversuche.

Die Ergebnisse dieser Versuche in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Außenmembranpräparationen weisen auf eine ähnliche Oberflächendichte von YadA der einzelnen YadA-Varianten und YadA-Hybride hin.

3.2 Adhärenz- und Invasionsverhalten der YadA-Varianten- und YadA-Hybrid-Stämme

Dass die Kopf-Region von YadA die Adhärenz an Kollagen und HeLa-Zellen vermittelt, ist bereits bekannt (Roggenkamp, *et al.*, 1996). Ebenso wurde gezeigt, dass weder Kopf- noch

pYV-Plasmide in <i>Y. enterocolitica</i> (WA-C)	Agglutination mit P1:O8	Agglutination mit P1-I	Autoagglutination	Immunfluoreszenz mit Mak 8D1
WA-C (pYV-AS)	-	-	-	-
WA-C (pYV-A1)	+++	+	++	++
WA-C (pYV-AS-8)	+++	+	++	++
WA-C (pYV-AS-3)	+++	+	++	++
WA-C (pYV-AS-I)	+	+++	++	++
WA-C (pYV-ASS-I)	+	+++	++	++
WA-C (pYV-AS-III)	+	+++	++	++
WA-C (pYV-ASS-III)	+	+++	++	++

Tabelle 13a: Vergleich der Antikörper-, Autoagglutination und Immunfluoreszenz der WA-C (pYV) Stämme

pACYC-Plasmide in <i>Y. enterocolitica</i> (WA-CΔinv)	Agglutination mit P1:O8	Agglutination mit P1-I	Autoagglutination	Immunfluoreszenz mit Mak 8D1
WA-C Δ inv (pAC-F)	-	-	-	-
WA-C Δ inv (pAC-F-A1)	+++	+	++	++
WA-C Δ inv (pAC-F-AS-8)	+++	+	++	++
WA-C Δ inv (pAC-F-AS-3)	+++	+	++	++
WA-C Δ inv (pAC-F-AS-I)	+	+++	++	++
WA-C Δ inv (pAC-F-ASS-I)	+	+++	++	++
WA-C Δ inv (pAC-F-AS-III)	+	+++	++	++
WA-C Δ inv (pAC-F-ASS-III)	+	+++	++	++

Tabelle 13b: Vergleich der Antikörper-, Autoagglutination und Immunfluoreszenz der WA-C Δ inv (pACYC) Stämme

<i>Y. pseudotuberculosis</i> Wildtypen und Deletionsmutanten	Agglutination mit P1:O8	Agglutination mit P1-I	Autoagglutination	Immunfluoreszenz mit Mak 8D1
IP-C (pYV32953::kan Δ yadA)	-	-	-	-
IP32953 (Wildtyp)	+	+++	++	++
YPIII-C (pIB1::kan Δ yadA)	-	-	-	-
YPIII (Wildtyp)	+	+++	++	++

Tabelle 13c: Vergleich der Antikörper-, Autoagglutination und Immunfluoreszenz der *Y. pseudotuberculosis* Stämme

Tabelle 13a-c: Vergleich von P1:O8- und P1-I-Antikörperagglutination, Autoagglutination und Immunfluoreszenz

Die verschiedenen Stämme wurden für Antikörper- und Autoagglutination über Nacht auf Blutagarplatten bei 27 °C angezüchtet und anschließend 5 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils eine Kolonie wurde entnommen, auf einen Objektträger gegeben und mit 15 μ l Anti-YadA_{ent}-Kaninchenserum P1:O8 (1:300) bzw. 10 μ l Anti-YadA_{ptb}-Kaninchenserum P1-I (1:300) zum Nachweis der Antikörperagglutination verrieben.

Zur Testung der Autoagglutination wurden Vorkulturen der Stämme in RPMI über Nacht bei 27 °C und anschließend Hauptkulturen in RPMI in Glasröhrchen angesetzt. Diese wurden bei 37 °C inkubiert und nach 12 Stunden ausgewertet.

Für die Immunfluoreszenz wurden die Stämme für 6 h bei 37 °C in BHI-Medium angezüchtet, gewaschen und mit dem monoklonalen Antikörper 8D1 (1:500) 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Zweitantikörper diente FITC-konjug. Ziege-Anti-Maus-IgG (1:300). Die so markierten Bakterien wurden im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Alle Ergebnisse wurden von drei unabhängigen Untersuchern bestätigt.

+++ = sehr deutliche Agglutination; ++ = deutliche Agglutination bzw. deutlich sichtbare Immunfluoreszenz, + = noch erkennbar vorhandene Agglutination, - = keine Agglutination bzw. keine Immunfluoreszenz

Konnektor-Region alleine für die Bindung an Kollagen und Epithelzellen ausreichen. Vielmehr sind beide zusammen als Bindungsmodul für die Adhärenzeigenschaften des Proteins zwingend notwendig. Zudem zeigte sich, dass die Länge der Stiel-Region keinen nachweisbaren Einfluss auf die Bindungsfähigkeit hat (Ackermann, 2005).

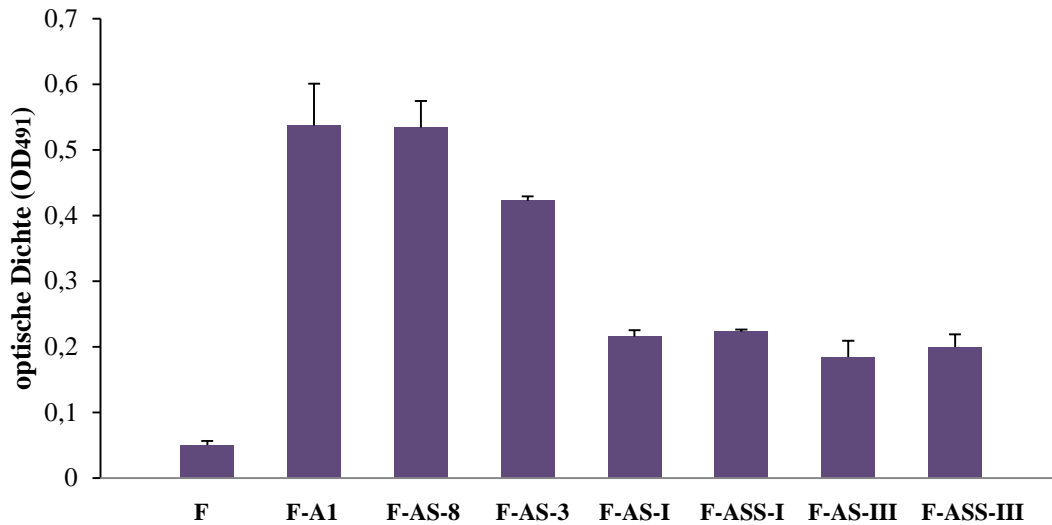
In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Varianten im YadA-Kopfbereich verschiedener *Y. enterocolitica*- und *Y. pseudotuberculosis*-Stämme und -Serotypen Einfluss auf das Bindungsverhalten an EZM-Proteine und HeLa-Zellen haben. Die Konnektor-Region all dieser Varianten ist ein genetisch hochkonservierter Bereich und nahezu identisch. Das YadA_{ent} des Serotyps O:3 unterscheidet sich zu den YadA_{ent}-Varianten der Serotyp O:8-Stämme WA314 und 8081 vor allem durch seine längere Stiel-Länge. Die YadA_{pstb}-Varianten weisen eine kürzere Stiel-Länge als die YadA_{ent}-Varianten auf (vgl. Abb.7). Somit lässt sich auch die Aussage des fehlenden Einflusses der Länge der Stiel-Region auf die Bindungsfähigkeit im Vergleich zu einem möglichen Einfluss der Kopf-Region überprüfen.

3.2.1 Adhärenzverhalten an Kollagen und Fibronektin

Um zu überprüfen, ob und inwiefern Unterschiede in der Kopf- und Stiel-Region von YadA-Varianten- und -Hybrid-Stämmen einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit an die EZM-Proteine Kollagen I und Fibronektin haben, wurden entsprechende ELISAs durchgeführt (siehe 2.2.23). Hierbei zeigte sich, dass die Stämme mit einem YadA_{ent} hochsignifikant stärker Kollagen I banden als die Stämme mit einem YadA_{pstb}. Zudem zeigte sich kein Unterschied zwischen den jeweiligen Stämmen mit einem vollständigen YadA_{pstb} und den entsprechenden WA-314-YadA-Kopfhybrid-Mutanten, die entweder die YadA_{pstb}-Kopf-Domänen von YPIII oder von IP32953 anstelle der WA-314-YadA_{ent}-Kopf-Domäne tragen. Dies zeigte, dass der Unterschied in der Adhärenz unabhängig von YadA-Stiellängenvariationen ist. Gleichzeitig zeigte sich, dass alle Mutanten hochsignifikant stärker an Kollagen I binden als die Negativ-Kontrolle WA-C Δ inv (pAC-F) (Abb.10A).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in den Versuchen mit Fibronektin (Abb.10B). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den jeweiligen Mutanten mit einem vollständigen YadA_{pstb} und den entsprechenden Kopfhybrid-Mutanten. Ebenfalls banden alle Mutanten hochsignifikant stärker an Fibronektin als die *yadA*-negative Kontrolle WA-C Δ inv (pAC-F). Im Vergleich der einzelnen YadA_{ent}-Varianten mit den YadA_{pstb}-Varianten zeigte sich, dass jeweils alle YadA_{ent}-Varianten signifikant stärker an Fibronektin banden als die YadA_{pstb}-

A: Kollagen I-Bindung



B: Fibronectin-Bindung

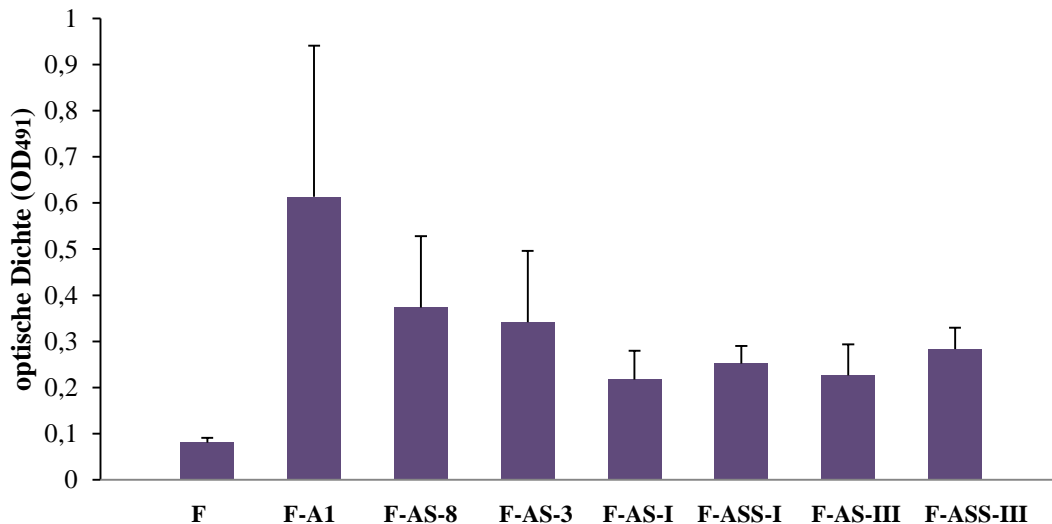


Abb.10: Bindung der YadA-Hybrid-Stämme (WA-CΔinv pACYC) an EZM-Proteine im ELISA.

A: Kollagen I B: Fibronectin (Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung)

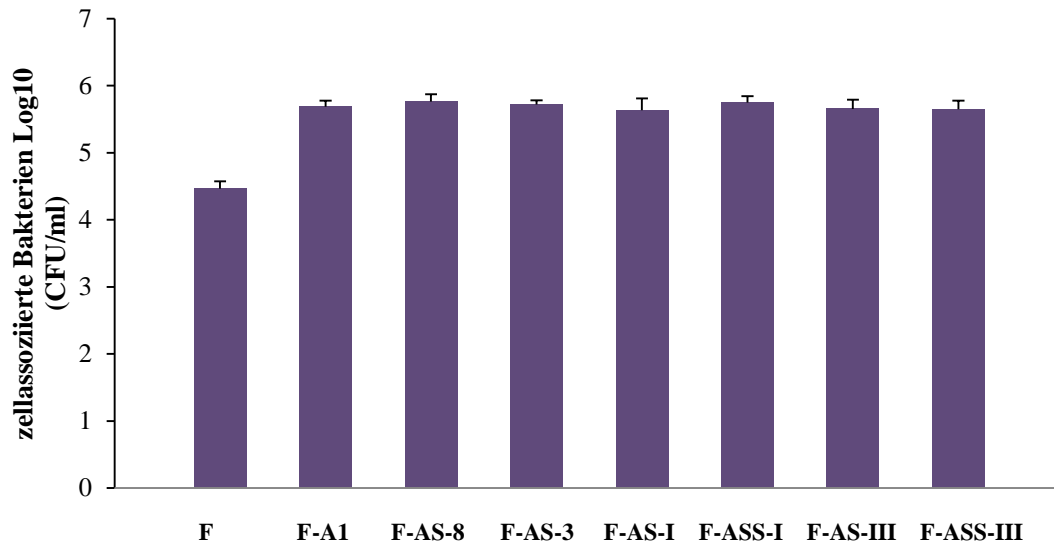
Dafür wurden mit Kollagen I (0,4 µg/ml) bzw. Fibronectin (0,1 µg/ml) inkubierte 96-Well-Platten mit BSA blockiert und danach die inaktivierten Yersinien-Stämme hinzugegeben. Erstantikörper: Anti-WA-C (1:10000), Zweitantikörper: POX-conj. Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (1:5000). Entwicklung mit pNPP und Messung der Extinktion bei 491 nm im Photometer gegen einen Leerwert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

A: $p < 0,0001$ jeweilige Werte aller Mutanten versus WA-CΔinv pAC-F Werte; $p < 0,0001$ jeweilige Werte aller *Y. enterocolitica*- Mutanten versus jeweilige Werte aller *Y. pseudotuberculosis*-Mutanten

B: $p < 0,0005$ jeweilige Werte aller Mutanten versus WA-CΔinv pAC-F Werte; $p < 0,05$ jeweilige Werte aller *Y. enterocolitica*- Mutanten versus jeweilige Werte der *Y. pseudotuberculosis*-Mutanten (pAC-F-AS-I, pAC-F-ASS-I, pAC-F-AS-III); $p < 0,01$ pA1 versus pAC-F-ASS-III

F = pAC-F ; F-A1 = pAC-F-A1 ; F-AS-8 = pAC-F-AS-8 ; F-AS-3 = pAC-F-AS-3 ; F-AS-I = pAC-F-AS-I ; F-ASS-I = pAC-F-ASS-I ; F-AS-III = pAC-F-AS-III ; F-ASS-III = pAC-F-ASS-III; jeweils in WA-CΔinv

A: HeLa-Zellbindung



B: HeLa-Zellinvasionsrate

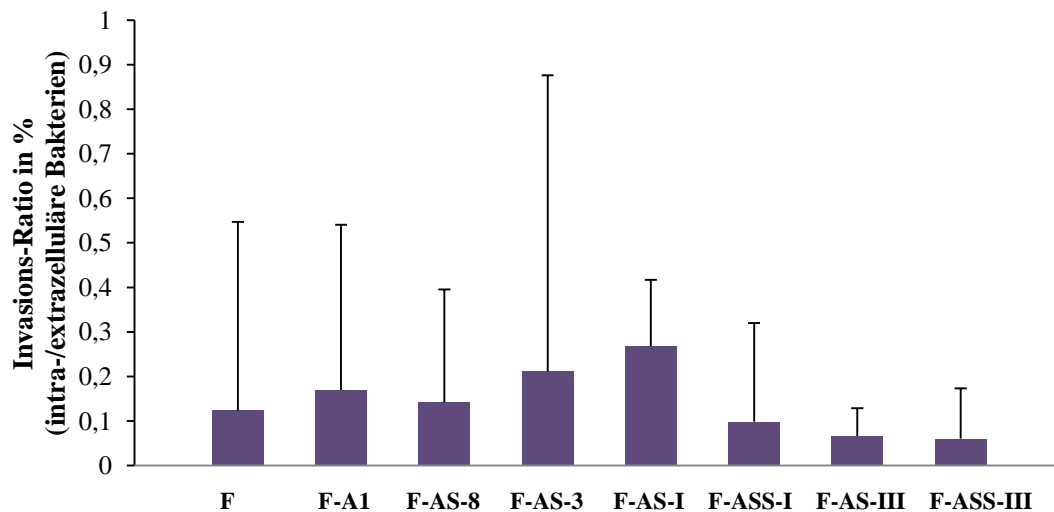


Abb.11: Interaktion der YadA-Hybrid-Stämme (WA-C Δ inv pACYC) mit HeLa-Zellen.

A: Adhärenz B: Invasionsrate (Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung)

A: $2,4 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden mit den Bakterien (MOI 50) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zahl der zellassozierten (intra- und extrazellulären) Bakterien ist als Auszählung der „colony forming units“ pro ml (CFU/ml) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente, welche in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden, dargestellt.

$p < 0,0001$ jeweilige Werte aller Mutanten versus WA-C Δ inv pAC-F Werte.

B: $2,4 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden mit den Bakterien (MOI 100) für 30 min bei 37 °C inkubiert, nach zusätzlicher Gentamicinbehandlung (50 μ g/ml) wurden sie für weitere 90 min inkubiert. Angegeben ist die Ratio der Mittelwerte intra- durch extrazelluläre Bakterien in Prozent. Die Ergebnisse wurden aus den Mittelwerten je dreier unabhängiger Experimente, welche in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden, ermittelt.

F = pAC-F ; F-A1 = pAC-F-A1 ; F-AS-8 = pAC-F-AS-8 ; F-AS-3 = pAC-F-AS-3 ; F-AS-I = pAC-F-AS-I ; F-ASS-I = pAC-F-ASS-I ; F-AS-III = pAC-F-AS-III ; F-ASS-III = pAC-F-ASS-III; jeweils in WA-C Δ inv

Varianten pAC-F-AS-I, pAC-F-ASS-I und pAC-F-AS-III. Beim Vergleich der YadA_{ent}-Varianten mit der YadA_{pstb}-Variante pAC-F-ASS-III zeigte sich allerdings nur zwischen dieser und pAC-F-A1 ein signifikanter Unterschied. Für die YadA_{ent}-Varianten pAC-AS-8 und pAC-AS-3 konnte mit p-Werten von $p = 0,1140$ (pAC-F-AS-8) und $p = 0,0875$ (pAC-F-AS-3) eine stärkere Bindung der beiden Varianten an Fibronektin nicht belegt werden. Allerdings zeigte ein Vergleich der gruppierten Werte der YadA_{pstb}-Varianten mit den jeweiligen Werten der YadA_{ent}-Varianten eine hochsignifikant stärkere Bindung letzterer an Fibronektin ($p \leq 0,0002$).

3.2.2 Adhärenz- und Invasionsverhalten mit HeLa-Zellen

Um die Interaktion der YadA-Hybrid-Stämme mit humanen Zellen zu vergleichen, wurden Adhärenz- und Invasionsversuche mit HeLa-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich in den Adhärenz-Versuchen mit HeLa-Zellen kein Unterschied zwischen den YadA_{ent}- und den YadA_{pstb}-Varianten. Vielmehr verhielten sich alle Stämme sehr ähnlich zueinander und waren in vergleichbarem Maße hochsignifikant (um etwa den Faktor 17) adhärenter als die *yadA*-negative Kontrolle WA-C Δ *inv* (pAC-F) (vgl. Abb.11A).

In den Versuchen zur Invasion in HeLa-Zellen zeigten sich im Vergleich zwischen den YadA_{ent}-Varianten und den YadA_{pstb}-Varianten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Zudem zeigten sich jedoch auch keine signifikanten Unterschiede in der Invasionsrate der *yadA*-positiven Varianten verglichen mit der *yadA*-negativen Kontrolle WA-C Δ *inv* (pAC-F) (vgl. Abb.11B).

3.3 Die Rolle der YadA-Varianten und -Hybride im Mausinfektionsmodell

Die Rolle von YadA-vermittelter Virulenz in *Y. enterocolitica* wurde im BALB/c-Mausinfektionsmodell untersucht. Hierfür wurden jeweils fünf BALB/c-Mäuse peroral mit folgenden *Yersinia*-Stämmen infiziert: pYV-AS, pYV-A1, pYV-AS-8, pYV-AS-3, pYV-AS-I, pYV-ASS-I, pYV-AS-III und pYV-ASS-III, jeweils in WA-C. Fünf Tage nach Oralinfektion wurde die Bakterienzahl (CFU) in Milz, Leber, Peyerschen Plaques, Lunge, Gehirn und im Darminhalt bestimmt (siehe 2.2.28.2). Um die Ergebnisse dieser Versuche interpretieren zu können, wurden weitere Mausinfektionsversuche mit den *Y. pseudotuberculosis* Wildtyp-Stämmen IP32953 und YPIII und den *Y. pseudotuberculosis*

yadA-Deletionsmutanten IP-C (pYV32953::kan $\Delta yadA$) und YPIII-C (pIB1::kan $\Delta yadA$) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wobei die o. g. Organe außer Lunge, Leber und Gehirn zur Keimzahlbestimmung und Histologie verwendet wurden.

Zusätzlich erfolgten der Nachweis und die Lokalisation der Yersinien in Immunfluoreszenz- und HE-gefärbten Gewebsschnitten.

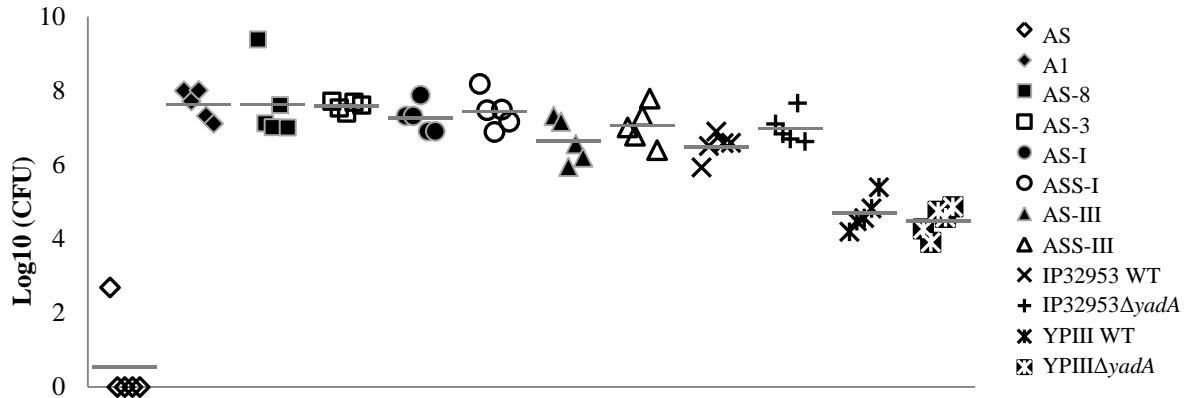
3.3.1 Vergleich der Mausvirulenz der Stämme mit *YadA*-Varianten und -Hybriden

Die stark abgeschwächte Mutante WA-C (pYV-AS) konnte in den Organen 5 Tage nach Oralinfektion nicht nachgewiesen werden. Sie diente damit als Negativ-Kontrolle (Neg-K). Es zeigte sich ein vergleichbar starker Befall des Darminhalts durch alle *yadA*-positiven WA-314-Mutanten. Alle Mäuse, die mit *YadA*-produzierenden Stämmen infiziert worden waren, waren stärker befallen als die mit der Negativ-Kontrolle infizierten Mäuse ($p < 0,01$). Zudem fand sich eine deutliche Kolonisierung der Peyerschen Plaques ($p < 0,01$ versus Neg-K) und der Milz durch die *yadA*-positiven Stämme. Allerdings fand sich, vermutlich aufgrund der geringen Gruppengröße, für die Milzbeteiligung für WA-C (pYV-AS-8) keine ($p \geq 0,05$) und für WA-C (pYV-ASS-III) nur eine marginale ($p < 0,05$) statistische Signifikanz gegenüber der Negativ-Kontrolle (andere: $p < 0,01$ versus Neg-K) (Abb.12). Bei der Auswertung von Lunge und Leber zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, weder jeweils zwischen den *yadA*-positiven Stämmen, noch zwischen diesen und der Negativ-Kontrolle. Nur für die Stämme WA-C (pYV-A1) und WA-C (pYV-AS-8) zeigte sich ein signifikant stärkerer Befall der Leber gegenüber der Negativ-Kontrolle ($p < 0,01$). Auch in der Auswertung der Gehirnproben zeigte WA-C (pYV-A1) einen signifikant stärkeren Befall gegenüber der Negativ-Kontrolle ($p < 0,01$), aber auch gegenüber WA-C (pYV-AS-3), WA-C (pYV-AS-I) und WA-C (pYV-ASS-III) ($p < 0,01$), während alle anderen *yadA*-positiven Stämme sich weder untereinander noch gegenüber der Negativ-Kontrolle signifikant unterschieden (Abb.13).

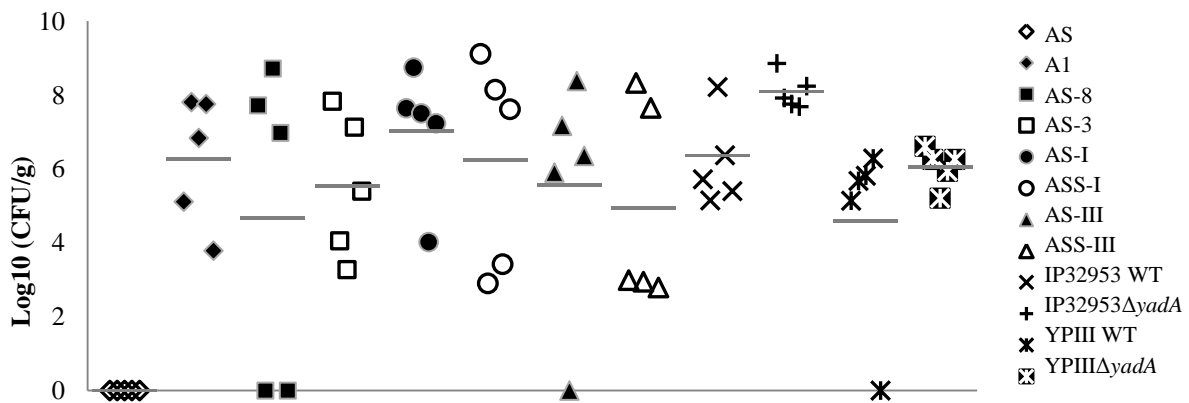
Vor dem Hintergrund des Gruppen intern sehr ungleichmäßigen und somit kaum aussagekräftigen Befalls von Leber, Lunge und Gehirn wurde auf die Auswertung dieser Organe in den weiteren Tierversuchen mit den Wildtyp-Stämmen YPIII und IP32953 und ihren *yadA*-Deletions-Mutanten verzichtet.

Der Vergleich der *Y. pseudotuberculosis*-Stämme zeigt, dass *Y. pseudotuberculosis* IP-C (pPY32953::kan $\Delta yadA$) trotz *yadA*-Deletion vergleichbar Darminhalt, Peyersche

Peyersche Plaques



Milz



Darminhalt

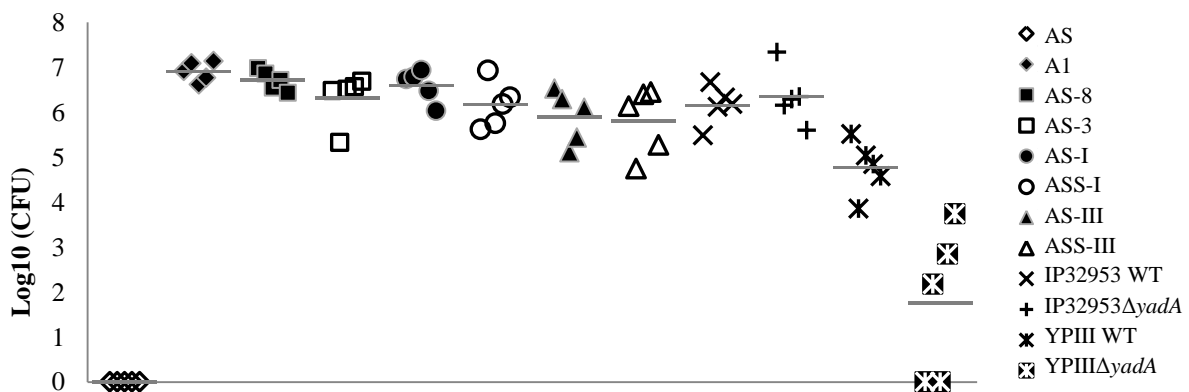


Abb.12: Quantifizierung YadA-exprimierender *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* nach peroraler Infektion in Mausorganen. (Darstellung der Einzelwerte und ihres Mittelwerts)

5 BALB/c-Mäuse (♀) wurden peroral mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS) (yadA-negativ), WA-C (pYV-A1), WA-C (pYV-AS-8), WA-C (pYV-AS-3), WA-C (pYV-AS-I), WA-C (pYV-ASS-I), WA-C (pYV-AS-III), WA-C (pYV-ASS-III), IP32953 Δ yadA, IP32953 (WT), YPIII Δ yadA und YPIII (WT) infiziert. 5 Tage nach Infektion erfolgte die Bestimmung der Bakterienzahl (CFU) im Darminhalt, den Peyerschen Plaques und der Milz. (WT = Wildtyp)

pYV-AS = pYV-AS; A1 = pYV-A1; AS-8 = pYV-AS-8; AS-3 = pYV-AS-3; AS-I = pYV-AS-I; ASS-I = pYV-ASS-I; AS-III = pYV-AS-III; ASS-III = pYV-ASS-III, jeweils in WA-C;

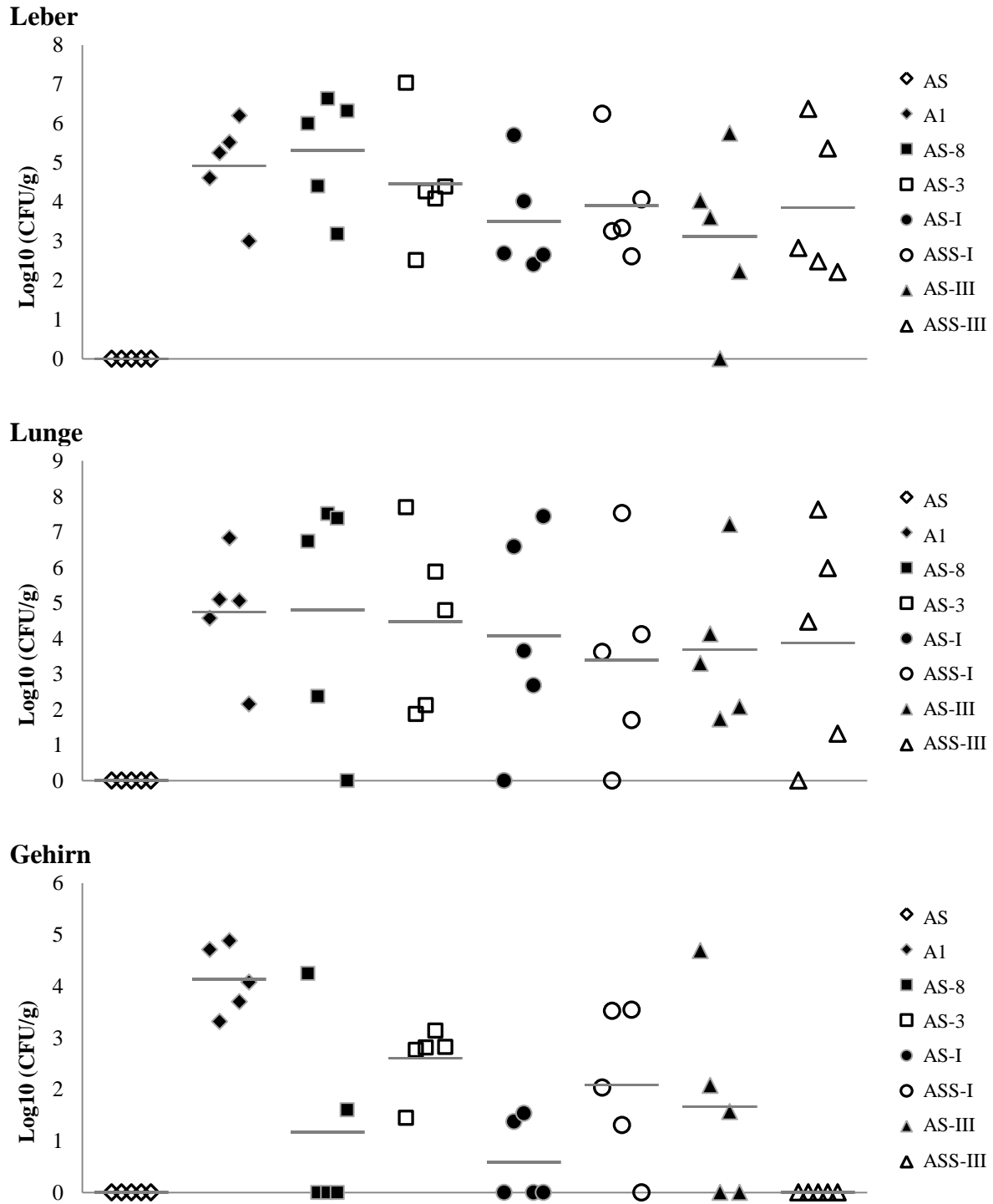


Abb.13: Quantifizierung *YadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* nach peroraler Infektion in Mausorganen. (Darstellung der Einzelwerte und ihres Mittelwerts)

Je 5 BALB/c-Mäuse (♀) wurden peroral mit 1×10^9 WA-C pYV-AS (*yadA*-negativ), WA-C (pYV-A1), WA-C (pYV-AS-8), WA-C (pYV-AS-3), WA-C (pYV-AS-I), WA-C (pYV-ASS-I), WA-C (pYV-AS-III) und WA-C (pYV-ASS-III) infiziert. 5 Tage nach Infektion erfolgte die Bestimmung der Bakterienzahl (CFU) in der Leber, der Lunge und im Gehirn.

pYV-AS = pYV-AS; A1 = pYV-A1; AS-8 = pYV-AS-8; AS-3 = pYV-AS-3; AS-I = pYV-AS-I; ASS-I = pYV-ASS-I; AS-III = pYV-AS-III; ASS-III = pYV-ASS-III, jeweils in *Y. enterocolitica* WA-C

Plaques und Leber befällt wie der *yadA*-positive Wildtyp. *Y. pseudotuberculosis* YPIII (pIB1) und seine *yadA*-negative Variante YPIII-C (pIB1::kan Δ *yadA*) koloniesieren ebenso in zueinander vergleichbarem Umfang die untersuchten Gewebe, jedoch in geringerem Ausmaß als IP32953 und IP-C (pPY32953::kan Δ *yadA*). Der Vergleich der *Y. pseudotuberculosis*-Stämme zeigt, dass *YadA* für deren Mauspathogenität keine wesentliche Rolle spielt, da die Organinfektionsraten der jeweiligen Deletionsmutanten keine Unterschiede zu jenen der entsprechenden Wildtyp-Stämme zeigen. Dieser Befund bestätigt von anderen Gruppen publizierte Ergebnisse (Rosqvist, *et al.*, 1988).

Im Vergleich der *Y. enterocolitica*-Stämme mit den *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen zeigt sich kein Unterschied der *yadA*-positiven WA-314-Varianten gegenüber dem *Y. pseudotuberculosis* Wildtyp-Stamm IP32953 und seiner *yadA*-Deletions-Mutante in Darm- und Milzbefall. Im Vergleich mit den *yadA*-positiven WA-314-Varianten finden sich signifikant geringere Keimzahlen in Darminhalt und Peyerschen Plaques der mit dem *Y. pseudotuberculosis* Wildtyp-Stamm YPIII und seiner *yadA*-Deletions-Mutante infizierten Mäuse. Allerdings finden sich keine Unterschiede in der Quantifizierung des Milzbefalls durch die *yadA*-positiven WA-314-Varianten im Vergleich mit den YPIII-Stämmen. Verglichen mit der *yadA*-negativen Kontrolle WA-C (pYV-AS) zeigten alle *Y. pseudotuberculosis*-Stämme eine höhere Keimlast in Darminhalt, Peyerschen Plaques und Milzgewebe.

Bemerkenswert in diesem Vergleich ist, dass im Falle beider *Y. pseudotuberculosis-yadA*-Deletions-Mutanten ein Versuchstier pro Gruppe vor Versuchsende verstarb, wobei sich in den untersuchten Organen keine entscheidend höhere Keimlast fand.

3.4 Histochemische Analyse

Je 5 BALB/c-Mäuse (♀) wurden peroral mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS) (*yadA*-negativ), WA-C (pYV-A1), WA-C (pYV-AS-8), WA-C (pYV-AS-3), WA-C (pYV-AS-I), WA-C (pYV-ASS-I), WA-C (pYV-AS-III), WA-C (pYV-ASS-III), IP32953, IP-C (pPY32953::kan Δ *yadA*), YPIII oder YPIII-C (pIB1::kan Δ *yadA*) infiziert. 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques und der Milz. Gewebsschnitte wurden mittels Kryomikrotomie hergestellt. Von diesen wurden Gewebsschnitte angefertigt und diese mittels Immunfluoreszenz- oder HE-Färbung angefärbt. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie

wurden Yersinien mit polyklonalem Kaninchen-anti-WA-C-Serum (WAVital) dargestellt und für die Gewebsbeurteilung eine HE-Färbung durchgeführt (vgl. 2.2.28 bis 2.2.32).

3.4.1 Peyersche Plaques

Die Peyerschen Plaques sind Ansammlungen von 10 bis 50 Lymphfollikeln, die in der Lamina propria und der Tela submucosa der Dünndarmschleimhaut liegen. Die Lymphfollikel sind Sekundärfollikel mit aktivem Keimzentrum und einem Randwall aus kleinen Lymphozyten, überwiegend B-Zellen. Den Bereich zwischen den Follikeln nennt man Interfollikularregion. Hier finden sich dicht liegende T-Lymphozyten. Zum Darmlumen hin zeigt sich eine kappenartige Ansammlung von T- und B-Zellen, welche als Dom bezeichnet wird. Der Dom wird von einem speziellen Zotten- und Krypten-freien Epithel bedeckt, welches sog. M-Zellen enthält. Diese transportieren Viren und Bakterien intrazellulär in die Submukosa wo z. B. dendritische Zellen (DCs) die Erreger in die Lymphozytenareale weiter transportieren (vgl. Abb.14). Die Peyerschen Plaques gehören zum lymphatischen System und sind Teil des GALT (Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Infektabwehr im Darm.

Die Auswertung der Gewebsschnitte zeigte, dass die *yadA*-positiven WA-314-Mutanten in den Peyerschen Plaques deutliche Abszesse mit erheblicher Schwellung hervorriefen. In der Analyse der Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI, WAVital und Ly6G zeigte sich, dass es in den Peyerschen Plaques der infizierten Mäuse zu einem entzündlichen Prozess mit ein bis mehreren Einzelabszessen und deutlichem Keimnachweis in diesen Abszessen gekommen war. Im Gegensatz hierzu fand sich bei der Infektion mit der *yadA*-negativen Mutante WA-C (pYV-AS) kein entzündlicher Prozess oder Keimnachweis in den Peyerschen Plaques.

Ebenso fand sich ein deutlicher Nachweis von Granulozyten (Ly6G-positiv) in den Abszessen, verstärkt im Randbereich, die Abszesse umrahmend. Um die Abszesse herum fanden sich durch DAPI kräftig angefärbte zellreiche Areale in ca. zwei Drittel der Aufnahmen (vgl. Abb.15 – Abb.25). In der Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI, B220 und CD11c zeigte sich im Vergleich mit der DAPI-WAVital-Ly6G-Färbung, dass diese rundlichen zellreichen Areale B-Zell-Ansammlungen (B220-positiv), also Follikeln entsprechen. Zudem ließ sich in diesen Aufnahmen im Bereich zwischen den Follikeln ein Netz von dendritischen Zellen (CD11c-positiv) nachweisen (vgl. Abb.20 & Abb.22). Ebenso fiel in dieser Färbung auf, dass sich in den Peyerschen Plaques, in denen keine Follikel dargestellt werden konnten, keine B-Zellen nachweisbar waren, weder in den Abszessen noch

umliegend (vgl. Abb.17 & Abb.18). Zwischen den verschiedenen untersuchten WA-314-Mutanten fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens oder der Ausprägung der Follikel. In den Peyerschen Plaques, in welchen keine Follikel dargestellt werden konnten, fanden sich je nur ein bis zwei Einzelabszesse (vgl. Abb.17 & Abb.18).

Bei den Peyerschen Plaques, in denen sich Follikel fanden, lassen sich zwei Gruppen unterscheiden. Zum einen fanden sich größere Einzelabszesse, die von mehreren kleineren B-Zell-Arealen umschlossen waren (vgl. Abb.20 – Abb.22). Zum anderen fanden sich Peyersche Plaques mit mehreren Abszessen, von denen einzelne bis wenige Follikel an den Rand gedrängt scheinen (vgl. Abb.19) oder die ein mit wenigen Follikeln durchsetztes Entzündungsbild zeigten (vgl. Abb.15 A1).

In der Auswertung der von den Gewebsschnitten der Peyerschen Plaques aus mit *Y. pseudotuberculosis*-Mutanten und -Varianten infizierten Mäusen gefertigten Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten sich ebenso deutliche Abszesse in den Peyerschen Plaques. Hierbei fiel auf, dass sich sowohl in den Peyerschen Plaques der Mäuse, welche mit *yadA*-positiven Varianten infiziert wurden, als auch in jenen, die mit *yadA*-negativen Mutanten infiziert wurden, Abszesse fanden, die sich in ihrer Ausprägung nicht erheblich unterscheiden. In allen in dieser Arbeit untersuchten Peyerschen Plaques aus mit *Y. pseudotuberculosis*-Mutanten und -Varianten infizierten Mäusen fanden sich die oben beschriebenen B-Zell reichen Follikel (vgl. Abb.23). Im Vergleich zeigte sich, dass die durch die *Y. pseudotuberculosis*-Mutanten und -Varianten ausgelösten Abszesse in den Peyerschen Plaques kleiner und die sie umliegenden Follikel im Verhältnis größer waren als bei den durch die WA-314-Mutanten ausgelösten entzündlichen Prozesse (vgl. Abb.16 – Abb.23).

Bei der Auswertung der HE-Färbungen der Gewebsschnitte der Peyerschen Plaques fand sich deutliche Zelllyse im Bereich der Abszesse. Die Gewebszerstörung war besonders ausgeprägt in den Bereichen, in denen sich in den Immunfluoreszenz-Aufnahmen eine hohe Keimlast nachweisen ließ (vgl. Abb.16 – Abb.20). Die Bereiche der B-Zell reichen Follikel zeigten sich in den HE-Aufnahmen stark basophil, somit zellkernreich (vgl. Abb.20 – Abb.22).

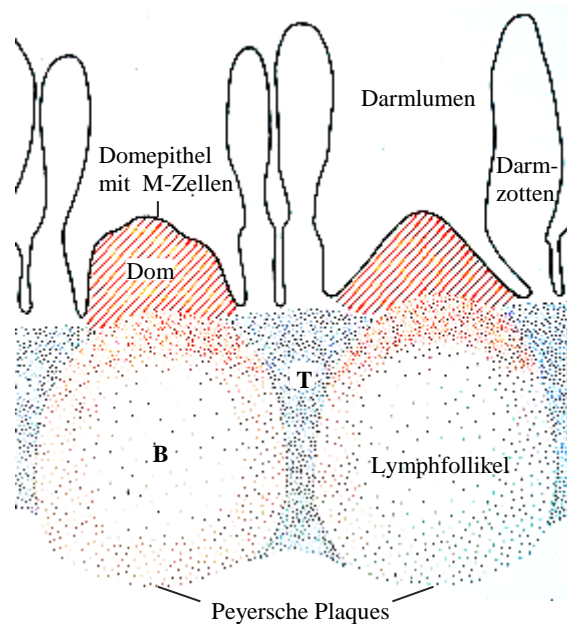
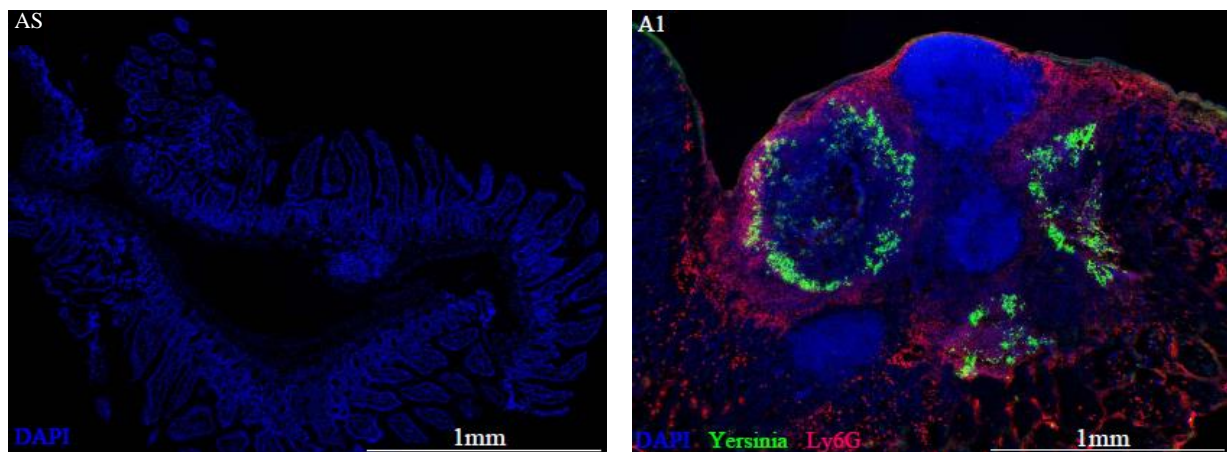


Abb.14: Schematische Darstellung von Peyerschen Plaques

Dargestellt sind zwei Peyersche Plaques mit vorwiegend aus B-Zellen bestehenden Lymphfollikeln, die zur Seite des Darmlumens vom Domareal überkuppelt werden. Das Domareal ist mit dem Domepithel bedeckt, welches M-Zellen enthält. Zwischen den Lymphfollikeln finden sich vermehrt T-Zellen. Zwischen den Peyerschen Plaques zum Darmlumen gerichtet finden sich normale Darmzotten.



DAPI: blau; Yersinia: grün (FITC); Ly6G: rot (Cy3)

Abb.15: Immunfluoreszenz-Färbung von Peyerschen Plaques infiziert mit WA-314-YadA-Varianten-Stämmen zur Darstellung von Yersinien und Granulozyten

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus oral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS) (*yadA*-negativ), WA-C (pYV-A1). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren. Sie erlauben den Vergleich zwischen einem infizierten und einem nicht-entzündlichen Peyerschen Plaques.

AS = pYV-AS; A1 = pYV-A1, jeweils in WA-C.

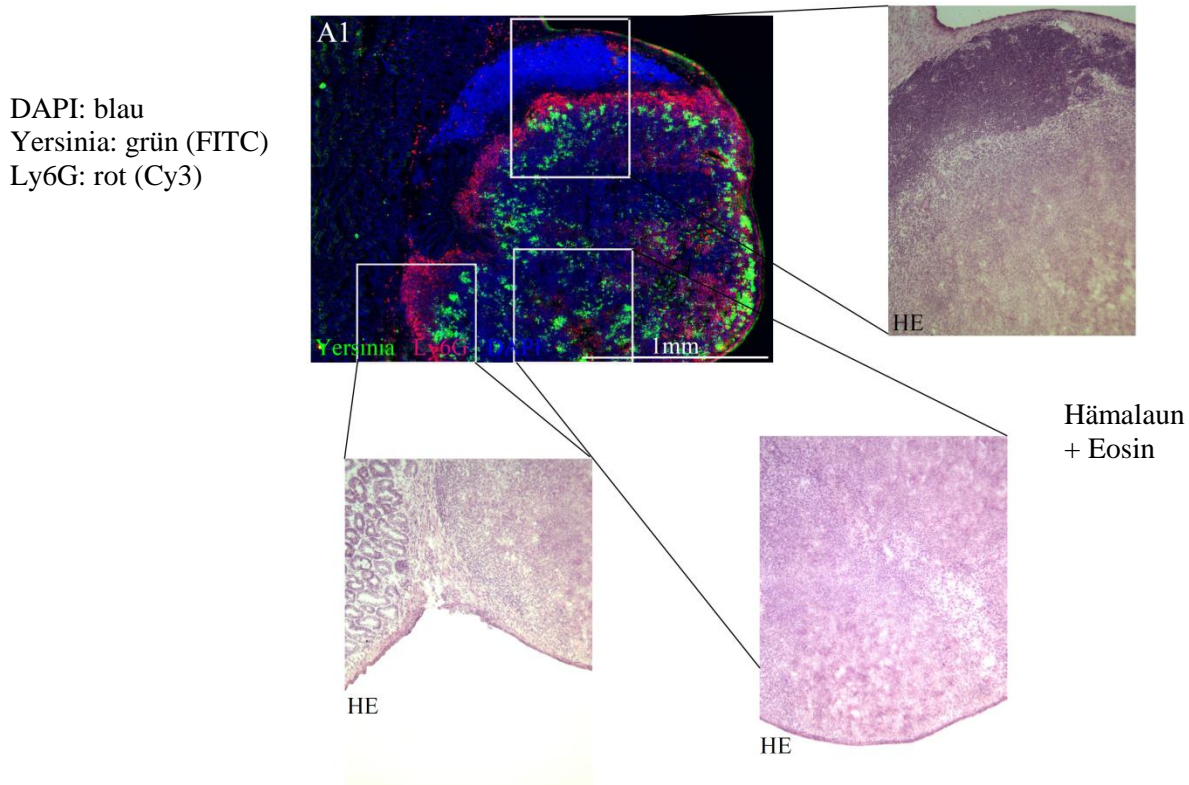


Abb.16: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-A1)

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte eines Peyerschen Plaque aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-A1). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Hier ist eine Übersichtsaufnahme in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

A1 = pYV-A1

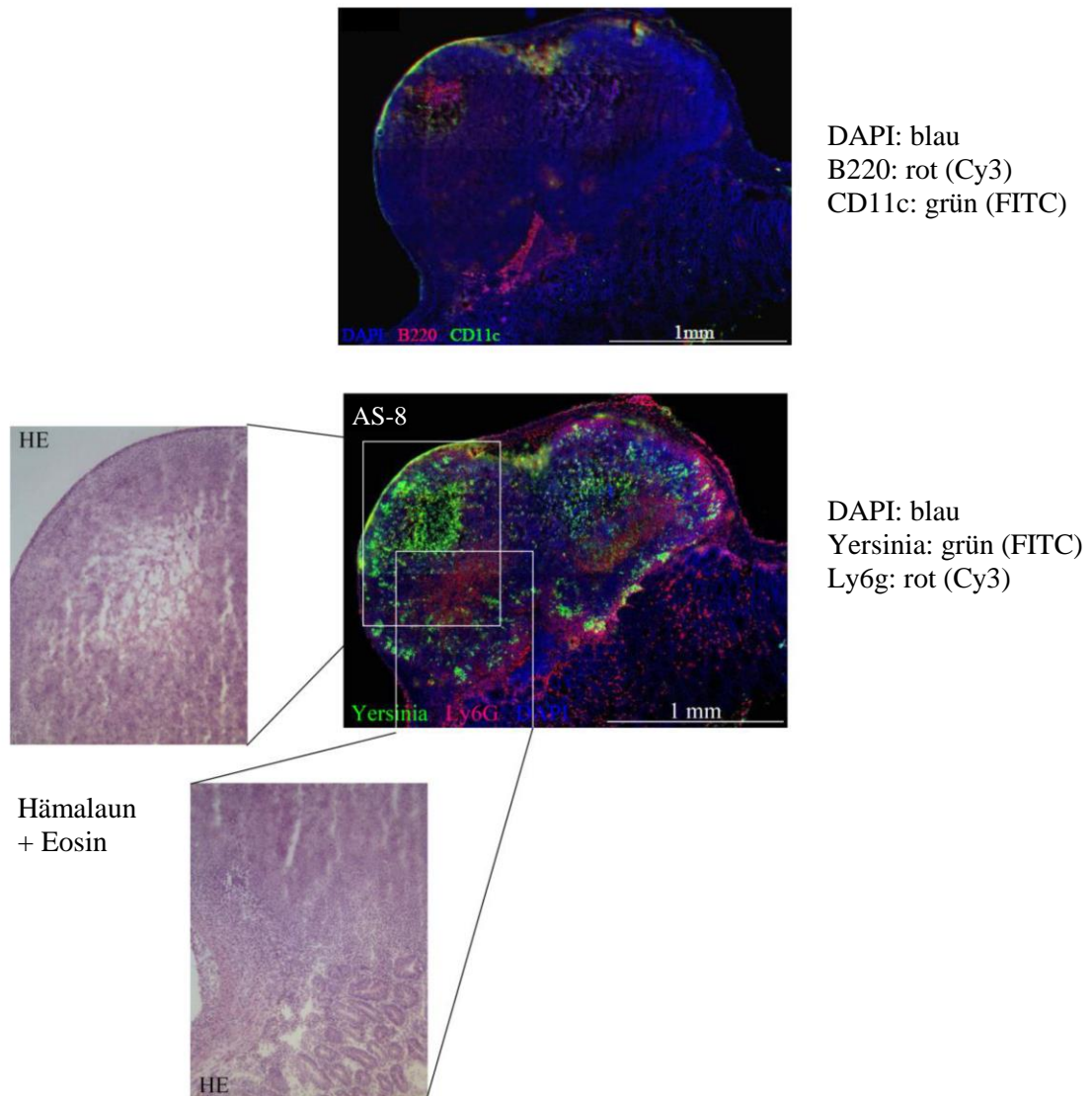
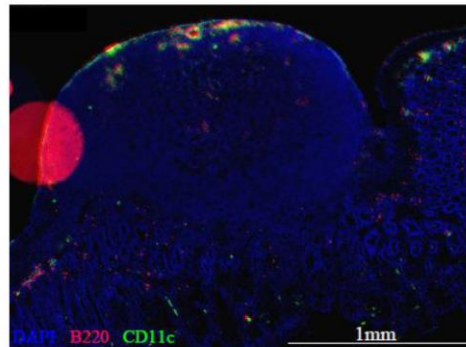


Abb.17: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital und Ly6G bzw. B220 und CD11c von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-AS-8)

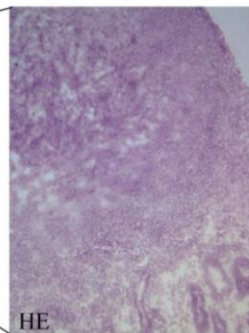
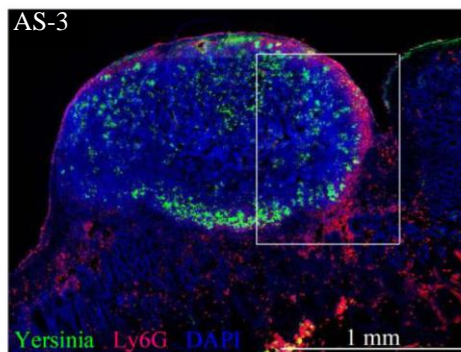
Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte eines Peyerschen Plaque aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS-8). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) bzw. B220 (Ratte; 1:50) und CD11c (arm. Hamster; 1:50) und den entsprechenden Sekundärantikörpern Cy3-Anti-Ratte (1:2000) und FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) bzw. FITC-Anti. arm. Hamster (1:2000) gefärbt. Hier sind Übersichtsaufnahmen in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

AS-8 = pYV-AS-8

DAPI: blau
B220: rot (Cy3)
CD11c: grün (FITC)



DAPI: blau
Yersinia: grün (FITC)
Ly6G: rot (Cy3)



Hämalaun
+ Eosin

Abb.18: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital und Ly6G bzw. B220 und CD11c von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-AS-3)
Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte eines Peyerschen Plaque aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS-3). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) bzw. B220 (Ratte; 1:50) und CD11c (arm. Hamster; 1:50) und den entsprechenden Sekundärantikörpern Cy3-Anti-Ratte (1:2000) und FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) bzw. FITC-Anti. arm. Hamster (1:2000) gefärbt. Hier sind Übersichtsaufnahmen in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

AS-3 = pYV-AS-3

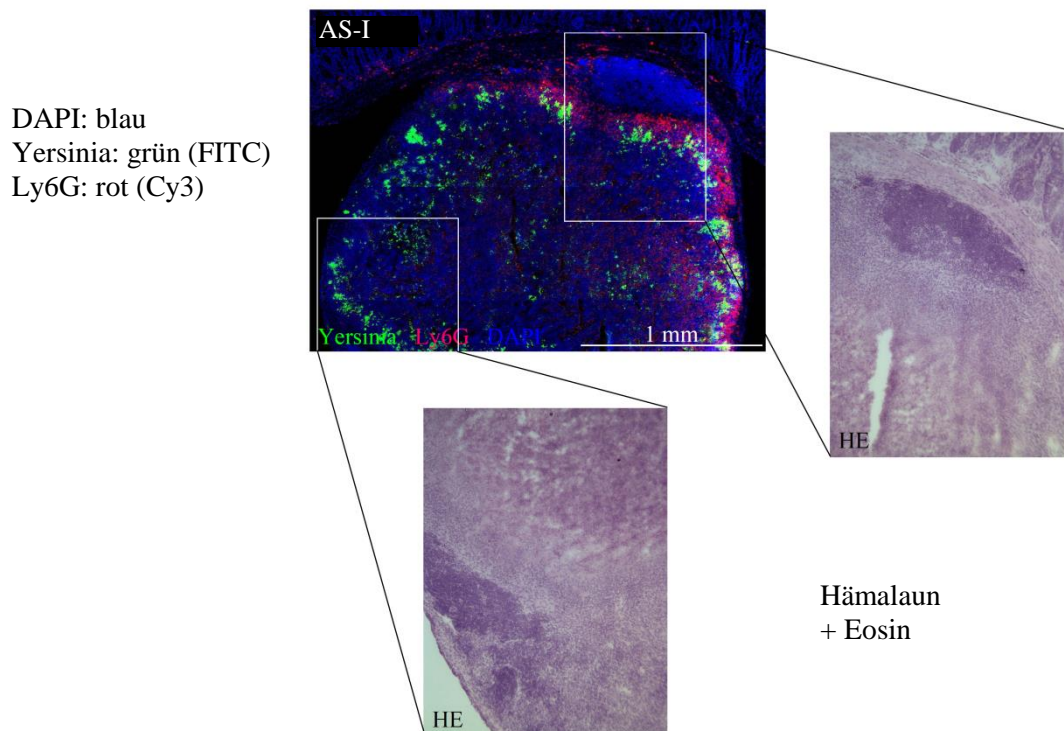
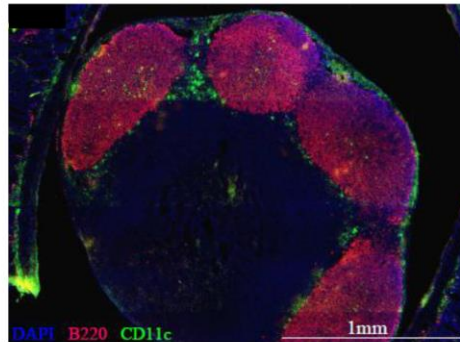


Abb.19: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-AS-I)

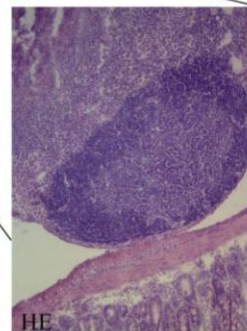
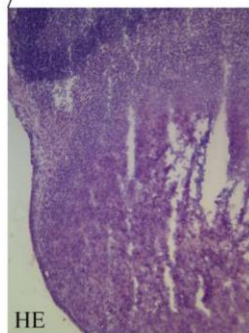
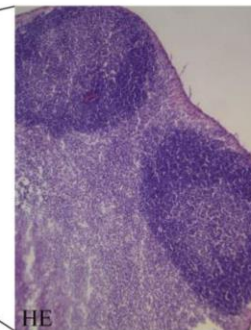
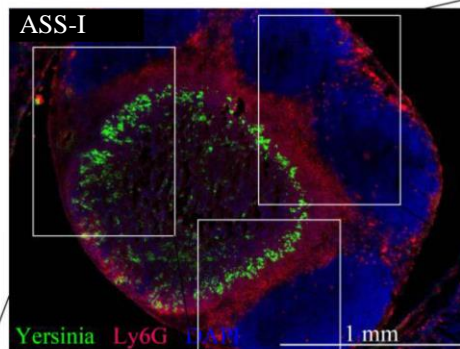
Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte eines Peyerschen Plaque aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS-I). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Hier ist eine Übersichtsaufnahme in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

AS-I = pYV-AS-I

DAPI: blau
B220: rot (Cy3)
CD11c: grün (FITC)



DAPI: blau
Yersinia: grün (FITC)
Ly6G: rot (Cy3)



Hämalaun
+ Eosin

Abb.20: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital und Ly6G bzw. B220 und CD11c von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-ASS-I)

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte eines Peyerschen Plaque aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-ASS-I). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) bzw. B220 (Ratte; 1:50) und CD11c (arm. Hamster; 1:50) und den entsprechenden Sekundärantikörpern Cy3-Anti-Ratte (1:2000) und FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) bzw. FITC-Anti. arm. Hamster (1:2000) gefärbt. Hier sind Übersichtsaufnahmen in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

ASS-I = pYV-ASS-I

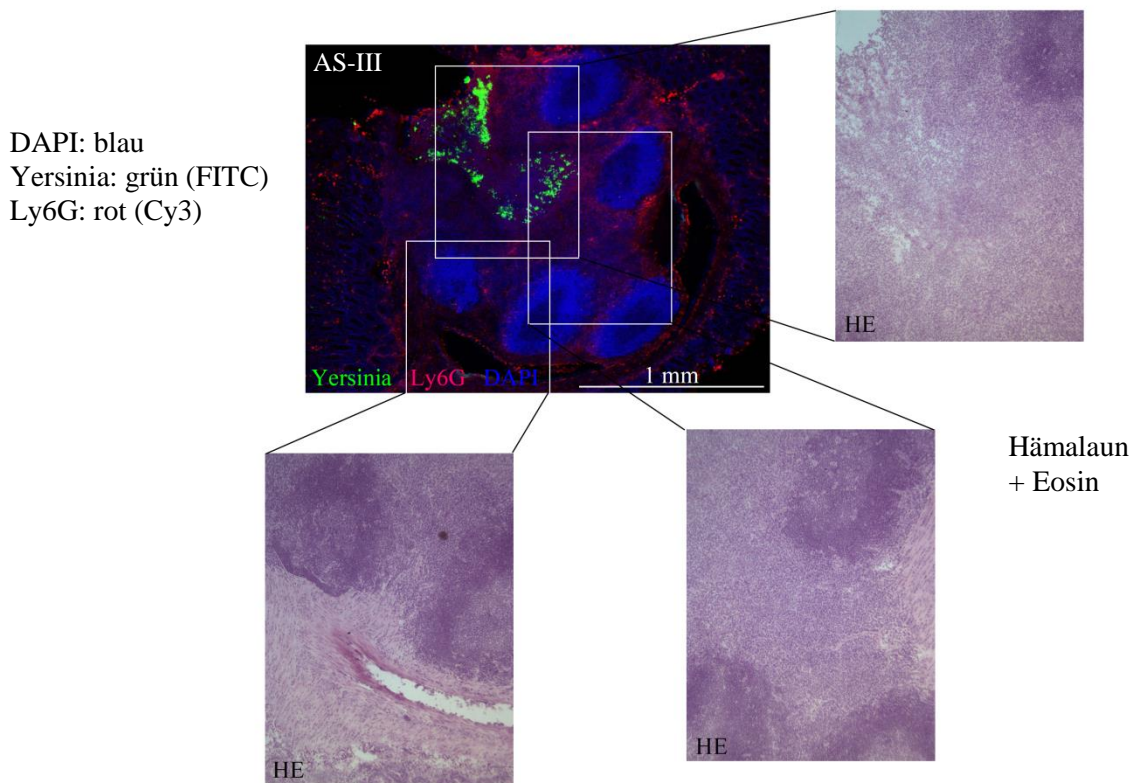
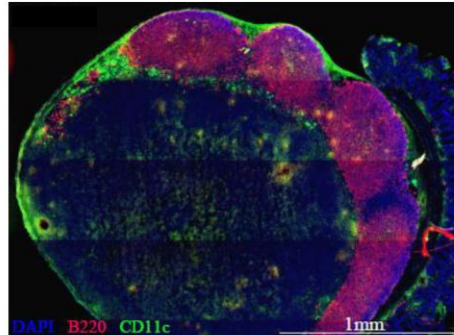


Abb.21: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-AS-III)

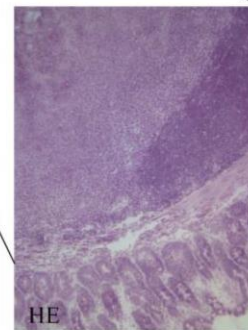
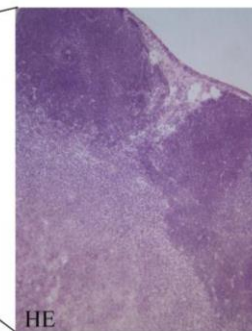
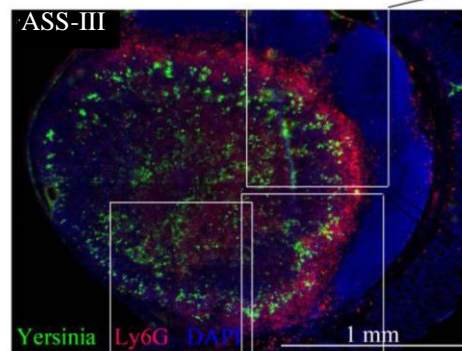
Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte eines Peyerschen Plaque aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS-III). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Hier ist eine Übersichtsaufnahme in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

AS-III = pYV-AS-III

DAPI: blau
B220: rot (Cy3)
CD11c: grün (FITC)



DAPI: blau
Yersinia: grün (FITC)
Ly6G: rot (Cy3)



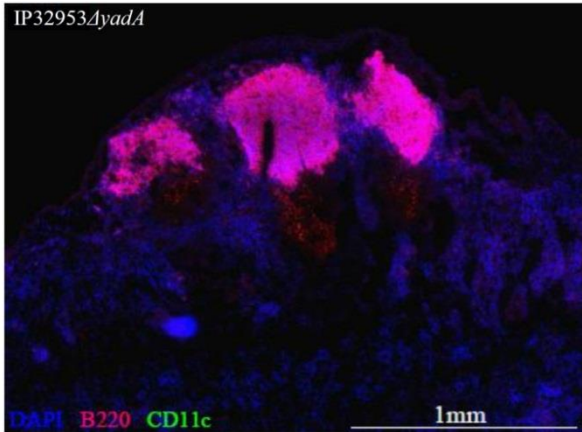
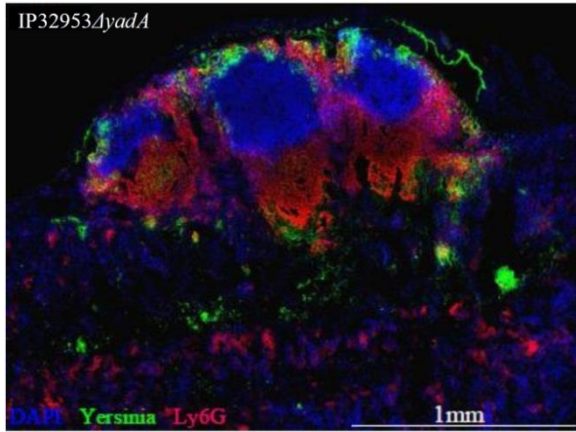
Hämalaun
+ Eosin

Abb.22: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital und Ly6G bzw. B220 und CD11c von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-ASS-III)

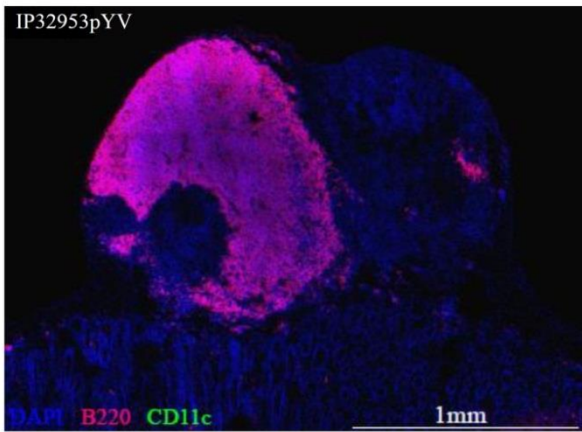
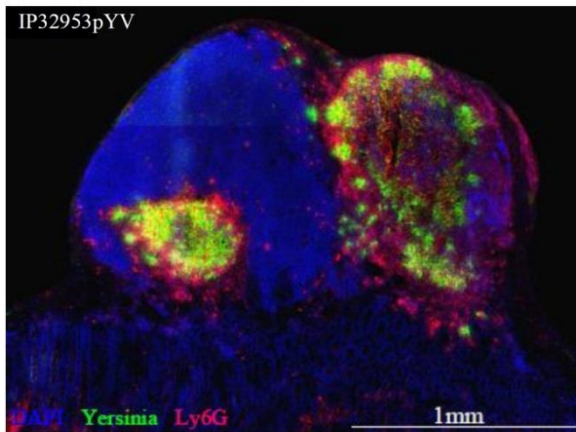
Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte eines Peyerschen Plaque aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-ASS-III). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) bzw. B220 (Ratte; 1:50) und CD11c (arm. Hamster; 1:50) und den entsprechenden Sekundärantikörpern Cy3-Anti-Ratte (1:2000) und FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) bzw. FITC-Anti. arm. Hamster (1:2000) gefärbt. Hier sind Übersichtsaufnahmen in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

ASS-III = pYV-ASS-III

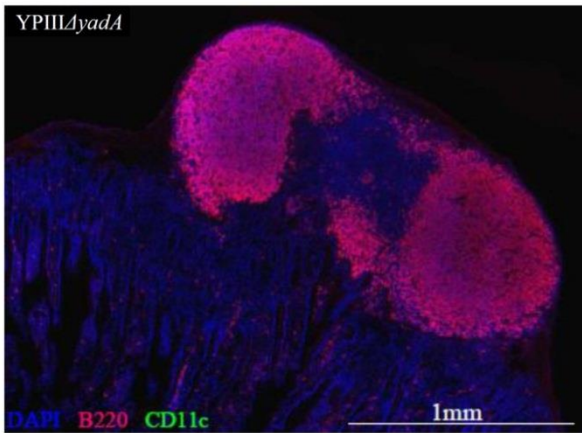
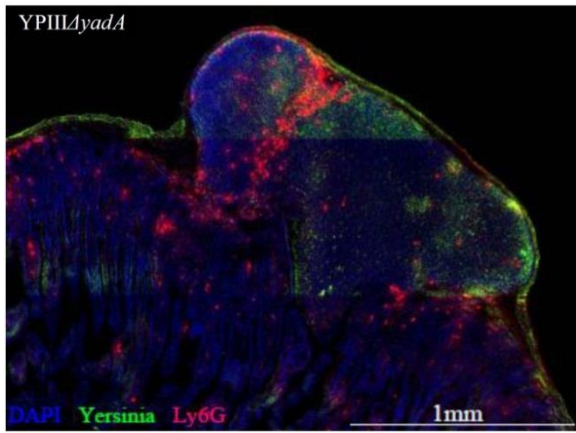
IP32953 $\Delta yadA$



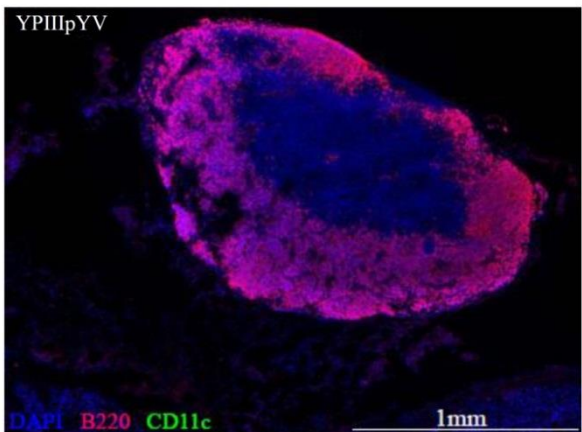
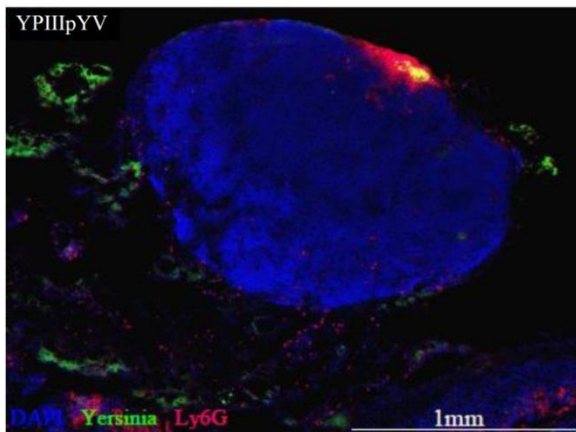
IP32953pYV



YPIII $\Delta yadA$



YPIIIpYV



DAPI: blau; Yersinia: grün; Ly6G: rot

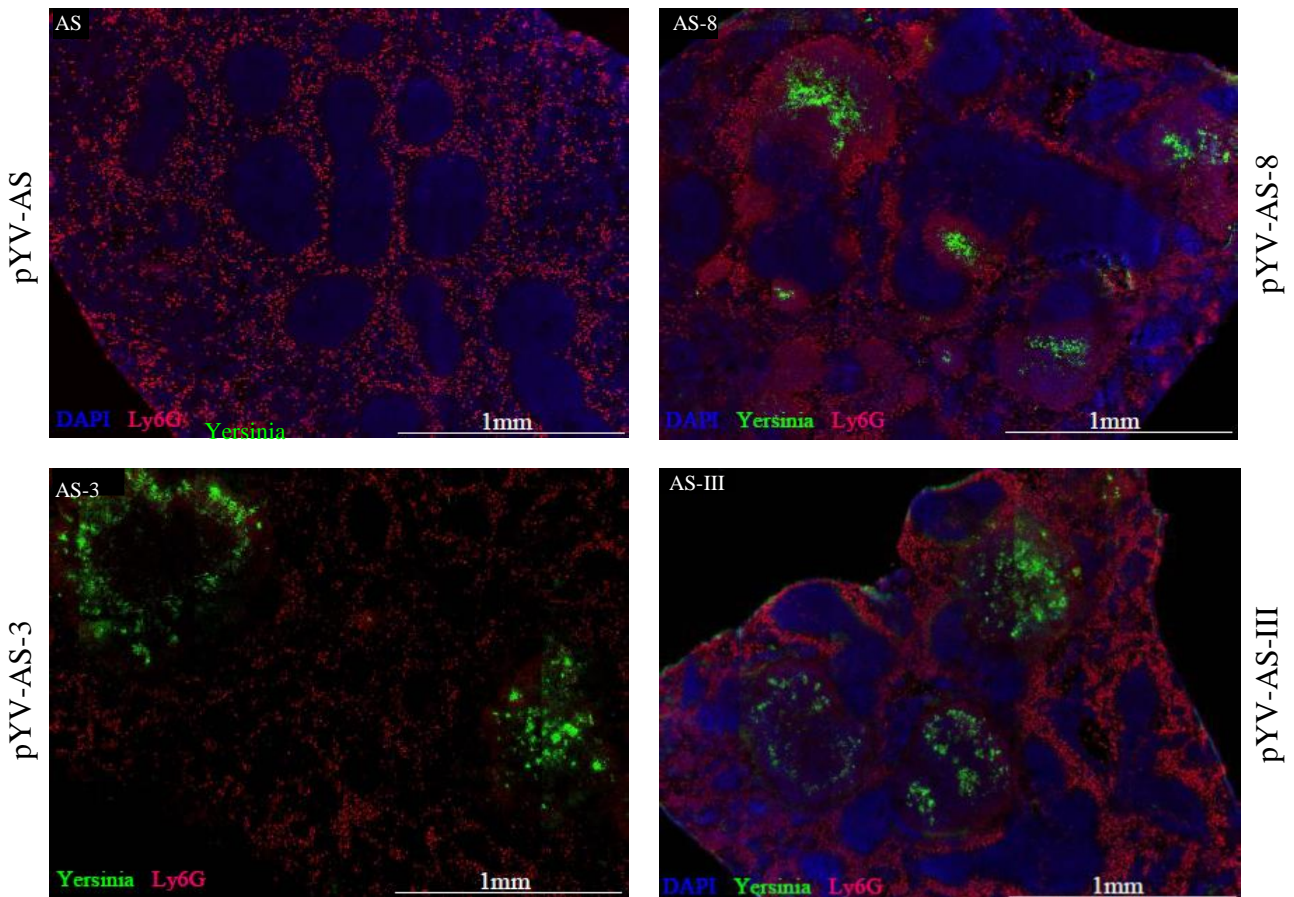
DAPI: blau; B220: rot; CD11c: grün

Abb.23: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Peyerschen Plaques infiziert mit *Y. pseudotuberculosis*-Mutanten

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 IP32953 $\Delta yadA$, IP32953pYV, YPIII $\Delta yadA$ und YPIIIpYV. 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) bzw. B220 (Ratte; 1:50) und CD11c (arm. Hamster; 1:50) und den entsprechenden Sekundärantikörpern Cy3-Anti-Ratte (1:2000) und FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) bzw. FITC-Anti. arm. Hamster (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

IP32953 $\Delta yadA$ = pYV32953::kan $\Delta yadA$ in IP-C; IP32953pYV = IP32953 mit pYV32953; YPIII $\Delta yadA$ = pIB1::kan $\Delta yadA$ in YPIII-C; YPIIIpYV = YPIII mit pIB1.

3.4.2 Milzen



DAPI: blau; Yersinia: grün (FITC); Ly6G: rot (Cy3)

Abb.24: Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Peyerschen Plaques infiziert mit WA-314 Hybrid-YadA

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte von Milzen aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS), WA-C (pYV-AS-8), WA-C (pYV-AS-3) und WA-C (pYV-AS-III). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Milzen. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

AS = pYV-AS; AS-8 = pYV-AS-8; AS-3 = pYV-AS-3; AS-III = pYV-AS-III, jeweils in WA-C.

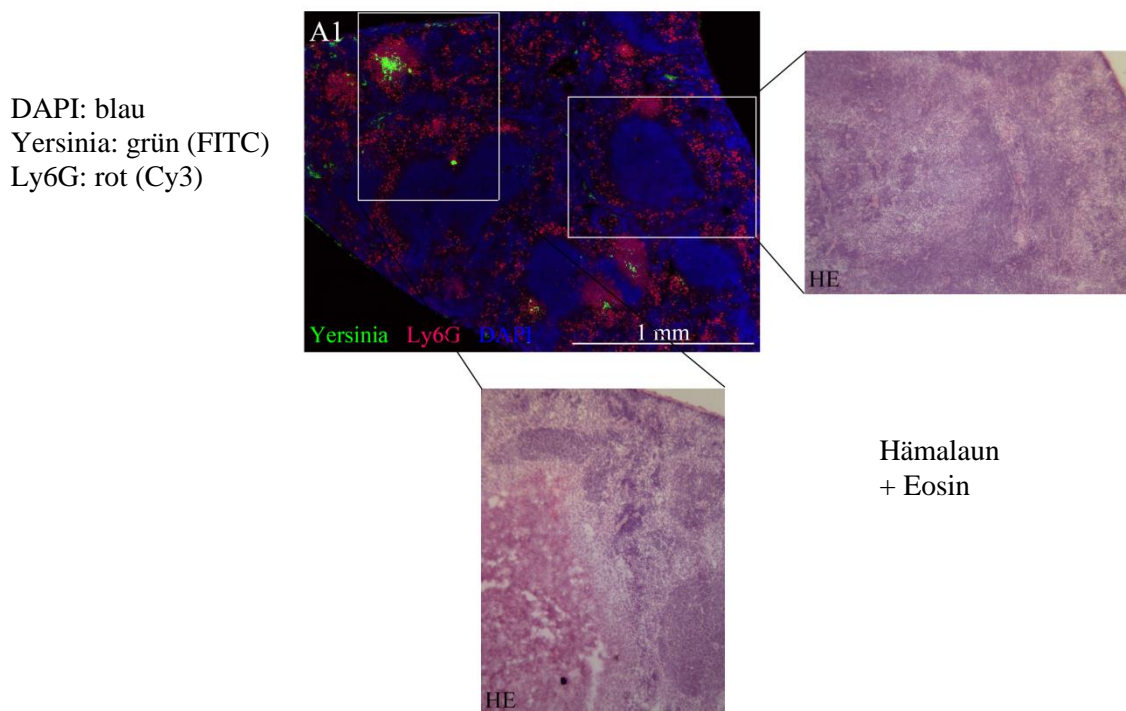


Abb.25: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Milzgewebe infiziert mit WA-C (pYV-A1)

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte einer Milz aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-A1). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Milz. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Hier ist eine Übersichtsaufnahme in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

A1 = pYV-A1

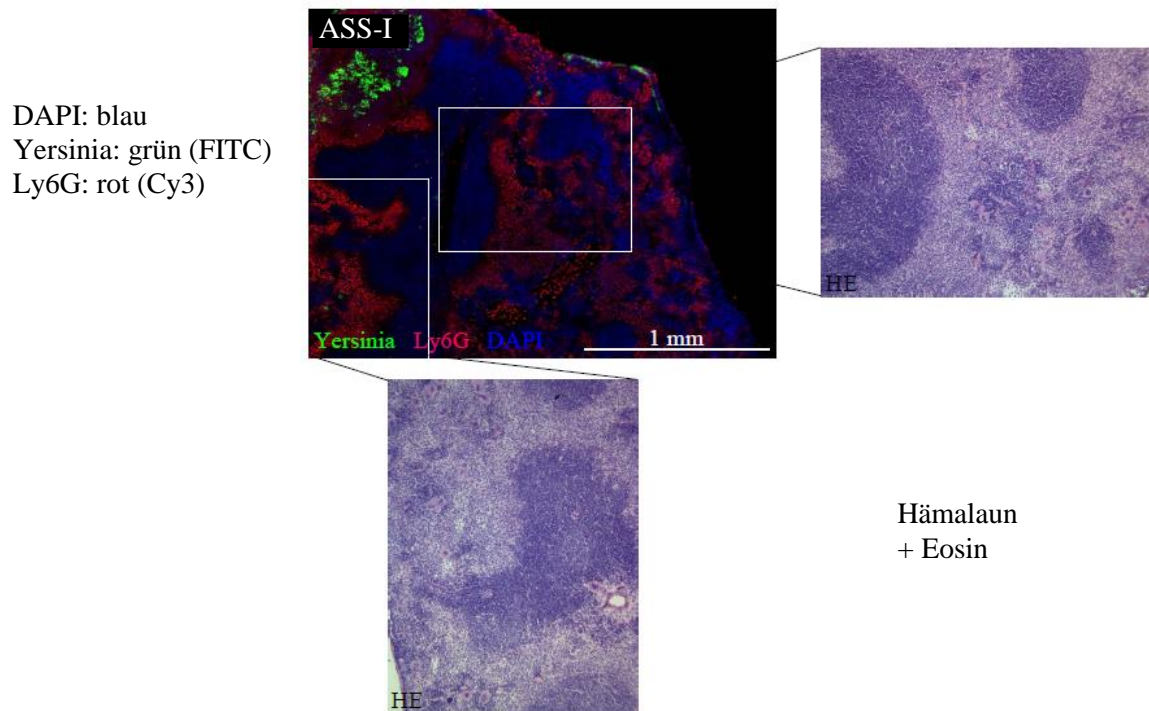


Abb.26: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Milzgewebe infiziert mit WA-C (pYV-ASS-I)

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte einer Milz aus peroral infizierten Balb-c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-ASS-I). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Milz. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Hier ist eine Übersichtsaufnahme in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

ASS-I = pYV-ASS-I

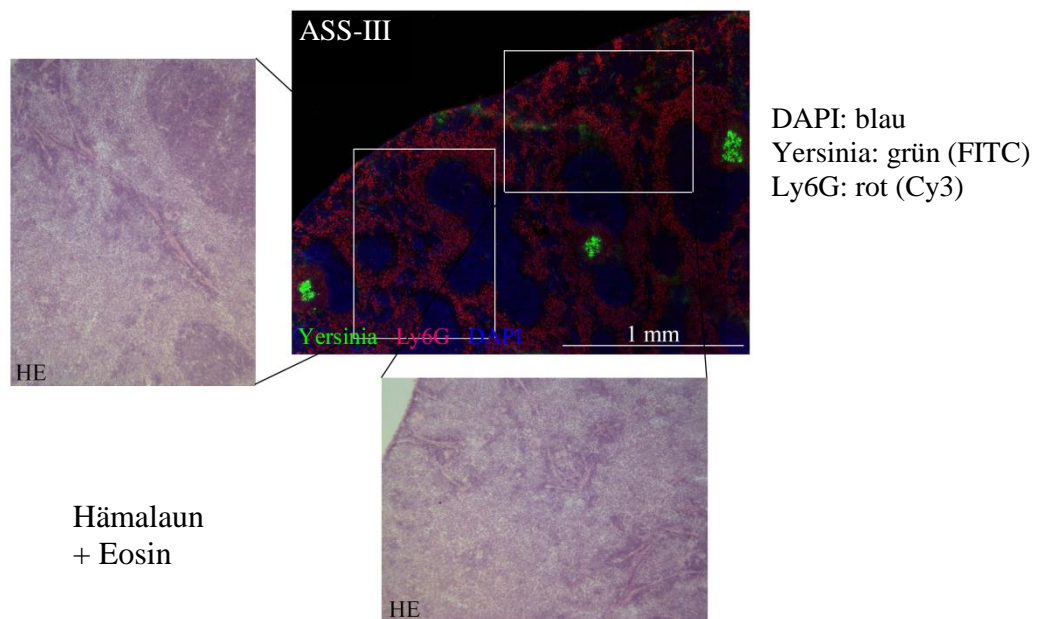
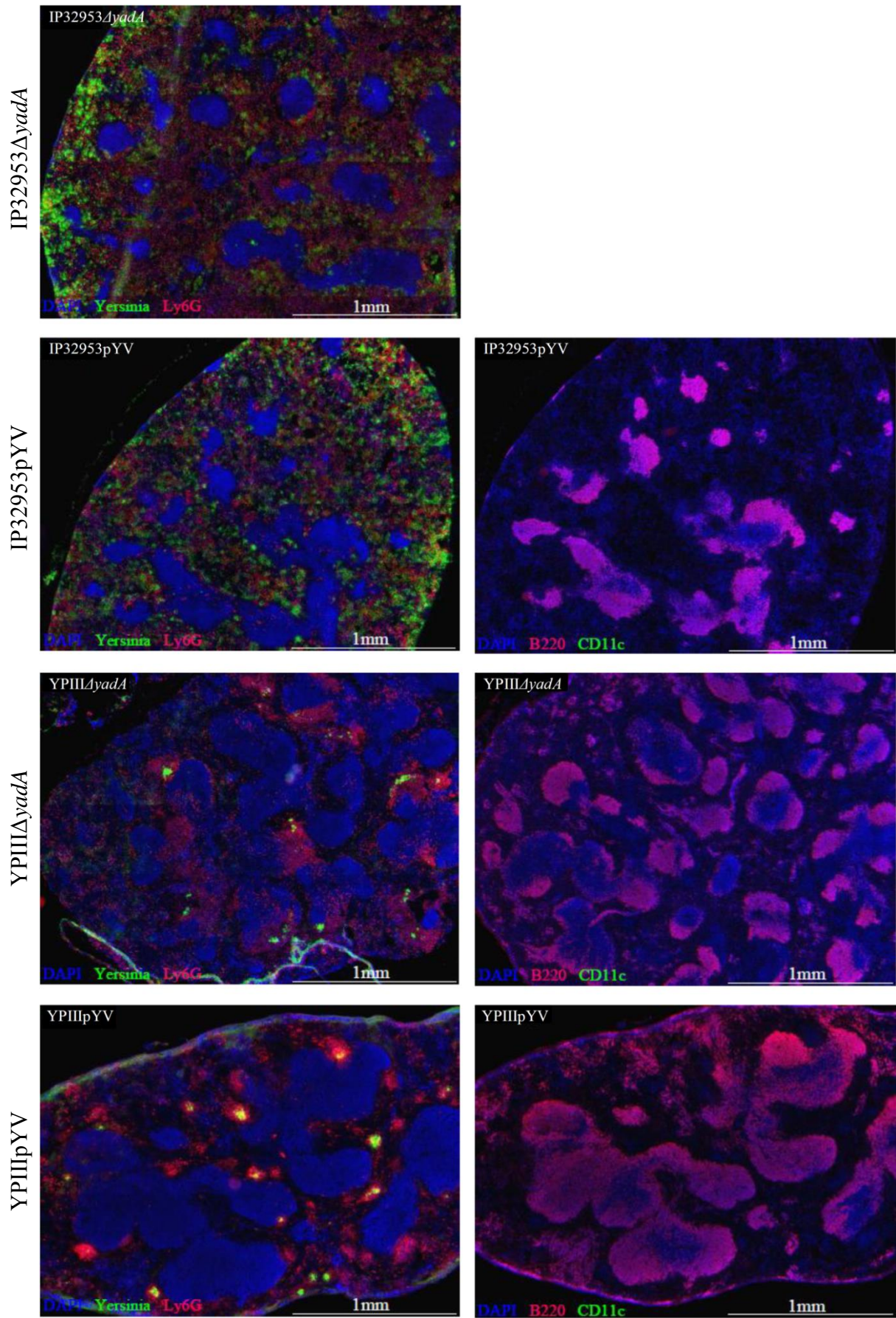


Abb.27: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Milzgewebe infiziert mit WA-C (pYV-ASS-III)

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte einer Milz aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-ASS-III). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Milz. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Hier ist eine Übersichtsaufnahme in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

ASS-III = pYV-ASS-III



DAPI: blau; Yersinia: grün; Ly6g: rot

DAPI: blau; B220: rot; CD11c: grün

Abb.28: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Milzen infiziert mit *Y. pseudotuberculosis* Mutanten

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte von Milzen aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 IP32953 $\Delta yadA$, IP32953pYV, YPIII::kan $\Delta yadA$ und YPIIIpYV. 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Milzen. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) bzw. B220 (Ratte; 1:50) und CD11c (arm. Hamster; 1:50) und den entsprechenden Sekundärantikörpern Cy3-Anti-Ratte (1:2000) und FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) bzw. FITC-Anti. arm. Hamster (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren

IP32953 $\Delta yadA$ = pYV32953::kan $\Delta yadA$ in IP-C; IP32953pYV = IP32953 mit pYV32953;
YPIII $\Delta yadA$ = pIB1::kan $\Delta yadA$ in YPIII-C; YPIIIpYV = YPIII mit pIB1.

Die Milz ist ein Zentrum des retikuloendothelialen Systems. Sie besteht aus der roten und der weißen Pulpa, die unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Die rote Pulpa dient der mechanischen Filtration der Erythrozyten (Erythrozytenmauserung) und beherbergt in den unter der Milzkapsel gelegenen Bereichen eine größere Monozytenreserve. Die weiße Pulpa dient der aktiven humoralen und zellvermittelten Immunantwort. Sie besteht aus Lymphfollikeln, den sog. Malpighi-Körperchen, in denen sich viele B-Zellen finden. Zudem zählen die T-Zell reichen periarteriellen lymphatischen Scheiden (PALS) zur weißen Pulpa.

In der Auswertung der von den Gewebsschnitten der Milzen aus mit WA-314-Mutanten infizierten Mäusen gefertigten Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen sich in den mit *yadA*-positiven Mutanten infizierten Milzen mehrere mittelgroße bis große Abszesse. Ebenso wie in den Abszessen in den Peyerschen Plaques findet sich auch in den Milzabszessen ein deutlicher Nachweis von Granulozyten (Ly6G-positiv) im Bereich der Abszesse, besonders im Randbereich, die Abszesse umrahmend. Im Gegensatz dazu zeigen sich die Milzen aus den mit der *yadA*-negativen Mutante WA-C (pYV-AS) infizierten Mäuse unversehrt (vgl. Abb.24). Im Vergleich der Milzen aus den mit *yadA*-positiven Mutanten infizierten Mäusen mit denen aus den mit WA-C (pYV-AS) infizierten Mäusen, zeigt sich zudem, dass die B-Zell-Bereiche der weißen Pulpa, hier erkennbar als die deutlich mit DAPI angefärbten zellreichen Bereiche, vergrößert sind (vgl. Abb.24).

In der Auswertung der von den Gewebsschnitten der Milzen aus mit *Y. pseudotuberculosis*-Mutanten und -Varianten infizierten Mäusen gefertigten Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen sich in den mit IP32953 (pYV32953) und IP-C (pYV32953::kan $\Delta yadA$) infizierten Milzen eine massive bakterielle Dissemination mit granulozytärer Infiltration (Ly6G-positiv) in der roten Pulpa, während sich in den verkleinerten B-Zell-Bereichen (B220-positiv) der weißen Pulpa kein Keimnachweis findet. Hierbei sind keine Unterschiede zwischen der *yadA*-positiven und der *yadA*-negativen Variante festzustellen (vgl. Abb.28). In den mit

YPIII (pIB1) und YPIII-C (pIB1::kan Δ yadA) infizierten Milzen finden sich viele kleine Abszesse, umschlossen von Granulozyten (Ly6G-positiv) in der roten Pulpa und vergrößerte B-Zell-Bereiche (B220-positiv) in der weißen Pulpa. Auch hier zeigen sich keine Unterschiede zwischen der yadA-positiven und der yadA-negativen Variante (vgl. Abb.28).

Im Vergleich sind die Abszesse in den mit den yadA-positiven WA-314-Mutanten infizierten Milzen größer und in der Anzahl weniger (1-5 pro Sichtfeld) als in den mit *Y. pseudotuberculosis*-Varianten und -Mutanten infizierten Milzen, in welchen sich viele kleine Abszesse (>10 pro Sichtfeld) bis hin zu einem disseminierten Befall der roten Pulpa finden.

Vergleichbar mit den Aufnahmen der HE-Färbungen von Gewebsschnitten der Peyerschen Plaques zeigen sich auch in den HE-Färbungen von Gewebsschnitten der Milzen eosinophile, lytische Bereiche in den Abszessen entsprechenden Regionen in der roten Pulpa. Die Lyse ist in dem Bereich besonders ausgeprägt, welcher der Hauptkeimlast im Abszess in den Immunfluoreszenz-Färbungen entspricht (vgl. Abb.25). Zudem finden sich im Bereich der weißen Pulpa stark basophile Bereiche, welche den B-Zell-Regionen in den Immunfluoreszenzfärbungen entsprechen (vgl. Abb.26 & Abb.27).

Im Gesamtvergleich lässt sich feststellen, dass das entzündliche Geschehen, das durch die yadA-positiven WA-314-Mutanten ausgelöst wird, die Peyerschen Plaques stärker betrifft als die Milz, wobei sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Mutanten findet. Bei dem durch die *Y. pseudotuberculosis*-Varianten und -Mutanten verursachten Infektionsverlauf findet sich das umgekehrte Bild eines stärkeren Milzbefalls bei etwas geringerer Beteiligung der Peyerschen Plaques. Zudem zeigt sich das die yadA-negative Mutante von WA-314 kein entzündliches Geschehen auslöst, während die ebenso yadA-negativen Mutanten IP-C (pPY32953::kan Δ yadA) und YPIII-C (pIB1::kan Δ yadA) in ihrer Entzündungsreaktion keine Unterschiede zu den yadA-positiven *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen zeigen.

4 Diskussion

Y. enterocolitica und *Y. pseudotuberculosis* verursachen beide Gastroenteritiden, unterscheiden sich allerdings im Krankheitsverlauf und bei Dissemination zum Teil im Organotropismus. Bislang ist unklar, wodurch diese Unterschiede bedingt werden. In der Frühphase bakterieller Infektionen stellt die Adhärenz an das Wirtsgewebe oftmals einen entscheidenden Schritt dar. Im Vergleich der YadA-Sequenzen zwischen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* fanden sich Unterschiede, die ein ungleiches Bindungsverhalten bedingen könnten. So wurde unter anderem diskutiert, ob eine zusätzliche Domäne in YadA_{pstb} verglichen mit YadA_{ent} eine stärkere Invasion vermitteln könnte (Heise, *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden verschiedene YadA-Varianten aus *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* in *Y. enterocolitica* WA-314 verglichen, um die Bedeutung besagter Unterschiede für *Y. enterocolitica* zu erörtern. Ebenso erfolgte ein Vergleich der WA-314-Mutanten mit den *Y. pseudotuberculosis* Wildtyp-Stämmen, um potentielle Unterschiede einordnen zu können.

4.1 Einfluss von YadA auf EZM-Bindung, HeLa-Zelladhärenz und -Invasion

In den Versuchen zur Adhärenz an EZM-Proteine und HeLa-Zellen zeigte sich eine signifikant stärkere Bindung aller *yadA*-positiven Stämme verglichen mit der Negativkontrolle WA-CΔ*inv* (pAC-F). Dies bestätigt die Feststellung, dass die Kollagen- und Fibronectinbindung sowie die Adhärenz von *Y. enterocolitica* an HeLa-Zellen durch die YadA-Kopfregion vermittelt wird (Roggenkamp, *et al.*, 1995a; Tahir, *et al.*, 2000; Terti, 1992). Zudem weisen die hier durchgeführten Versuche darauf hin, dass die YadA-Kopf-Domäne unter Nutzung der homologen Regionen in der Neck-Domäne ohne Beeinträchtigung der Funktionalität von YadA ausgetauscht werden kann.

In dieser Arbeit konnte eine signifikant stärkere Bindung der *Y. enterocolitica* WA-314-Varianten mit einem YadA_{ent} an Kollagen I und Fibronectin gezeigt werden als jener mit einem YadA_{pstb} bzw. einer YadA_{pstb}-Kopfregion, was darauf hinweist, dass die Kopfregion der YadA_{ent}-Varianten eine höhere Affinität an diese EZM-Proteine vermittelt. Allerdings zeigen sich keine entsprechenden Unterschiede in den Adhärenzversuchen an HeLa-Zellen. Somit muss davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede in der Kollagen I- und Fibronectin-Bindungsfähigkeit nicht einfach auf die Adhärenz an HeLa-Zellen übertragen werden können, auch wenn HeLa-Zellen von EZM umgeben sind. Vorstellbar ist, dass die in

der YadA_{pstb}-Kopfreion zusätzlich vorhandenen Bereiche zu diesen Unterschieden im Bindungsverhalten führen. Eine geminderte Kollagenbindung könnte einen Überlebensvorteil im Wirtsorganismus darstellen, was ein Grund dafür sein könnte, warum sich in *Y. pseudotuberculosis* ein funktionell komplexeres YadA entwickelt hat. So wurde unlängst gezeigt, dass YadA exprimierende *Y. enterocolitica*-Stämme an NETs (neutrophil extracellular traps) binden (Casutt-Meyer, *et al.*, 2010). PNMs, welche die erste Abwehr gegen invadierende mikrobielle Pathogene darstellen, schütten „granule proteins“ und Chromatin aus, die gemeinsam die NETs formen (Mayer-Scholl, *et al.*, 2004; Nathan, 2006). Diese binden und töten gram-positive und gram-negative Bakterien (NET-Killing) (Brinkmann, *et al.*, 2004; Buchanan, *et al.*, 2006; Wartha, *et al.*, 2007; Weinrauch, *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass das Ausmaß der NET-Bindung von der Ausprägung der Kollagenbindefähigkeit abhängt. So waren *yadA*-negative *Y. enterocolitica*-Stämme und *Y. pestis*-Wildtypstämme nicht anfällig für NET-Killing, während *Y. pestis*-Stämme nach Komplementation mit funktionalem YadA hierfür anfällig wurden. *Y. enterocolitica*-Mutanten mit verminderter Kollagenbindung waren währenddessen weniger sensitiv für NET-Killing als der Wildtyp (Casutt-Meyer, *et al.*, 2010). Es ist allerdings auch schon länger bekannt, dass die Kollagenbindungsfähigkeit essenziell für das Überleben intragastral inokulierter *Y. enterocolitica* ist (Tamm, *et al.*, 1993). Zudem wurde gezeigt, dass YadA, wie auch Ail, als C4bp-Rezeptor agiert. C4bp ist ein Inhibitor sowohl des klassischen als auch des Lektin-Komplement-Wegs. Die C4bp-Bindung könnte *Y. enterocolitica* helfen, der Komplement-vermittelten Abwehr im menschlichen Wirt zu entgehen (Kirjavainen, *et al.*, 2008). YadA ist somit für enteropathogene Yersinien gleichzeitig Angriffspunkt und Virulenzfaktor, indem es Serumresistenz und Kollagenbindung vermittelt, was erklärt, warum es trotz der erhöhten Anfälligkeit für NET-Killing auf dem Virulenzplasmid enteropathogener Yersinien erhalten blieb (Casutt-Meyer, *et al.*, 2010).

Die Invasionsrate in HeLa-Zellen (wie hier dargestellt) lag einheitlich unter 1 % und zeigte keinen Unterschied zwischen den *yadA*-positiven Varianten und der *yadA*-negativen Kontrollvariante WA-C Δ *inv* (pAC-F). Eine invasionsvermittelnde Eigenschaft YadAs für *Y. enterocolitica* WA-314 lässt sich somit hier nicht nachweisen, besonders im Vergleich zu Invasin vermittelten Invasionsraten (Isberg, 1989). Dies entspricht vorangehenden Studien, wonach keine YadA_{ent}-vermittelte Internalisierung nachgewiesen werden konnte (Heesemann, 1987; Schmid, *et al.*, 2004). Allerdings zeigen sich Unterschiede zu Studien, die ein effizientes YadA_{pstb}-vermitteltes Eindringen in nicht phagozytierende Zellen fanden. Dieser

Prozess soll, genau wie die Invasin vermittelte Zellinvasion, β 1-Integrin abhängig verlaufen (Eitel, *et al.*, 2002; Heise, *et al.*, 2006).

4.2 Rolle von YadA im in vivo Mausmodell

Der Vergleich des Infektionsausmaßes in der histologischen Auswertung des Mausmodells zwischen den *yadA*-positiven *Y. enterocolitica* WA-314-Stämmen und den *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen in dieser Arbeit zeigt einen relativ stärkeren Milzbefall durch letztere und einen stärkeren Befall der Peyerschen Plaques durch die WA-314-Stämme. Dies legt einen unterschiedlichen Infektionsverlauf nach Oralinfektion nahe. Man könnte vermuten, dass *Y. enterocolitica* länger in den Peyerschen Plaques verweilt und dort zu einer heftigen Entzündungsreaktion führt, während sich bei den *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen eine Dissemination mit relativ stärkerem Milzbefall findet. In der quantitativen Auswertung des Wirtsorganbefalls in dieser Arbeit zeigt sich, dass alle *yadA*-positiven WA-314-Stämme die Wirtsorgane stärker befielen als WA-C (pYV-AS). Allerdings zeigten sich keine Unterschiede im Ausmaß des Organbefalls durch die verschiedenen *yadA*-positiven WA-314-Varianten. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass WA-314 für den Erhalt seiner Mauspathogenität YadA benötigt, was vorhergehende Studien bestätigt (Roggenkamp, *et al.*, 1995a; Skurnik, *et al.*, 1989; Tamm, *et al.*, 1993). Allerdings zeigt es auch, dass es nicht von Relevanz ist, welche der untersuchten YadA-Varianten von WA-314 exprimiert wird, was darauf hindeutet, dass der Infektionsverlauf nicht von der exprimierten YadA-Variante abhängt. Zudem ist es scheinbar ebenso belanglos welche der untersuchten YadA-Kopfreionen von WA-314 exprimiert werden, da sich weder zwischen den YadA_{ent} und den $\text{YadA}_{\text{pstb}}$ -Varianten noch den YadA_{ent} - $\text{YadA}_{\text{pstb}}$ -Kopfmutanten Unterschiede im Infektionsverlauf fanden.

4.2.1 Disseminationswege

Im Allgemeinen finden sich enteropathogene Yersinien binnen 24 Stunden nach Oralinfektion von Mäusen in mesenterialen Lymphknoten (MLN) und erscheinen nach 48-72 Stunden in Leber und Milz (Pepe, *et al.*, 1995; Sinclair, *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen führten zu einem Modell, nachdem enteropathogene Yersinien nach Ingestion das Darmlumen kolonisieren und durch antigensammelnde M-Zellen durch das Epithel des Dünndarms

transloziert werden, was in einer Kolonisierung des submukosalen lymphatischen Gewebes der Peyerschen Plaques resultiert (Grutzkau, *et al.*, 1990; Hanski, *et al.*, 1989b). Folgend könnten die Yersinien auf dem Blut- und/oder Lymphweg in die MLN gelangen oder in extraintestinale Organe wie Leber und Milz über die Blutbahn disseminieren (Carter, 1975; Handley, *et al.*, 2004; Pepe, *et al.*, 1993).

Es wurde noch ein alternativer Disseminationsmechanismus vorgeschlagen, nachdem enteropathogene Yersinien die Kolonisierung der Peyerschen Plaques umgehen können und direkt vom Darm aus in systemische Gewebe disseminieren (Barnes, *et al.*, 2006; Handley, *et al.*, 2005). Allgemein zeigen enteropathogene Yersinien sowie *Y. pestis* einen ausgesprochenen Tropismus für lymphatisches Gewebe (Putzker, *et al.*, 2001; Smego, *et al.*, 1999). Allerdings wurde gezeigt, dass organisiertes intestinal-lymphatisches Gewebe für die Dissemination von enteropathogenen Yersinien in innere Organe entbehrlich ist (Handley, *et al.*, 2005). So zeigte die Infektion von Mäusen mit unterentwickelten Peyerschen Plaques mit *Y. pseudotuberculosis* keine frühe bakterielle Translokation in Leber und Milz, aber 6 Tage nach Inokulation Kolonisationslevel in diesen Organen, die denen von Mäusen mit Peyerschen Plaques entsprechen (Barnes, *et al.*, 2006). Es lässt sich vermuten, dass intestinale, villöse M-Zellen gemeinsam mit Invasin die effiziente Dissemination enteropathogener Yersinien in Abwesenheit von Peyerschen Plaques steuern (Handley, *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse führten zu einem Modell, nachdem die Bakterien, die systemische Infektionen auslösen, nicht aus der Population stammen, die das Darmepithel kurz nach oraler Inokulation überwinden. B-Zell abhängige Prozesse wie die Organogenese der Peyerschen Plaques wären demnach wichtig für frühe aber nicht für späte Stadien extraintestinaler Dissemination. Es scheint wahrscheinlich, dass das Auftreten von Bakterien in der Blutbahn kurz nach oraler Inokulation für den Wirt vorteilhaft ist, da es frühe „Immunosurveillance“ und damit Gegenwehr gegen bakterielle Replikation in diesen Geweben erlaube. In der zweiten Infektionsphase stammten die meisten Bakterien in Milz und Leber nicht von den Bakterien, die sich in regionalen Lymphknoten vermehrten (Barnes, *et al.*, 2006; Handley, *et al.*, 2005). Dies passt zu Resultaten vorhergehender Studien mit Salmonella (Mecenas, *et al.*, 2001). Weiter scheint eine verlängerte Replikation von *Y. pseudotuberculosis* im Dünndarm vor dem Eindringen in Leber und Milz eine Voraussetzung für erfolgreiches Wachstum in diesen Geweben und damit für eine systemische Infektion zu sein (Barnes, *et al.*, 2006). *Y. enterocolitica* zeigte hingegen bei Wachstum im Dünndarmlumen stark verminderte Invasivität (Oellerich, *et al.*, 2007).

Es wurde gezeigt, dass Invasin-deletierte Mutanten enteropathogener Yersinien fähig sind, binnen 6 Tagen Leber und Milz zu befallen, auch wenn sie kurz nach der Infektion nicht an M-Zellen binden und Peyersche Plaques nur mit verlangsamter Kinetik kolonialisieren. Weiter zeigten sie eine dem Wildtyp äquivalente LD50 (Pepe, *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse stützen einerseits die Überlegung eines alternativen Wegs intestinaler Translokation enteropathogener Yersinien, der die Peyerschen Plaques umgeht, andererseits lässt sich vermuten, dass zumindest ein Infektionsweg der Milz Invasin-unabhängig verläuft (Handley, *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede im Infektionsverlauf zeigten sich ohne jegliche Abhängigkeit dieses Verlaufs von YadA, welches im Fall von WA-314 auch gegen ein YadA_{pstb} ausgetauscht werden oder in den untersuchten *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen ganz deletiert werden konnte, ohne negativen Einfluss auf den Infektionsverlauf zu nehmen. Vorstellbar ist, dass enteropathogene Yersinien zwar beide diskutierten Disseminationswege nutzen können, dass aber *Y. enterocolitica* den Weg über die Peyerschen Plaques bevorzugt, während *Y. pseudotuberculosis* vornehmlich direkt aus dem Darmlumen disseminiert.

Die quantitative Auswertung des Keimbefalls von Lunge, Leber und Gehirn in dieser Arbeit zeigte keinen gleichförmigen Organbefall, so dass hier eine Analyse bezüglich eines YadA-Varianten-abhängigen Organotropismus nicht möglich war. Vielmehr könnte man den Befall von Leber, Lunge oder Gehirn als Hinweis auf eine, auf die Organe bezogen, zufällige hämatogene Streuung deuten. Diese Überlegung lässt sich zudem dadurch stützen, dass sich die Werte für einen Befall der einzelnen Organe innerhalb einer Auswertungsgruppe nicht grundsätzlich aus einem Tier rekrutieren, was vermuten ließe, dass dieses individuell eine stärkere Keimdissemination erfahren hätte. Es zeigt sich, dass sich der Befall von Lunge, Leber und Gehirn oftmals isoliert in unterschiedlichen Tieren einer Gruppe findet. Diese Ergebnisse passen zu der Überlegung, dass enteropathogene Yersinien auf zwei Wegen zu distalen Infektionsorten gelangen können, nachdem sie die intestinale Barriere überwunden haben. Bakterien in der Blutbahn könnten über das Portalvenensystem wandern, das intestinales Blut direkt zur Leber transportiert. Nach venöser Lungenpassage können die Bakterien dann arteriell in die Milz und andere Organe gelangen. Alternativ könnten Bakterien, die in die Lymphwege eindringen eventuell über den Ductus thoracicus in die Blutbahn gelangen. In beiden Fällen zeigt die Kolonisierung von systemischen Organen an, dass Bakterien zu einem Zeitpunkt in der arteriellen Blutbahn präsent sein müssen (Barnes, *et al.*, 2006).

4.2.2 Interaktion mit lymphatischen Zellen

Einige Pathogene wie *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp, *Brucella* spp und andere, wie Viren und Parasiten, sind in der Lage eine Lymphadenitis auszulösen. Diese Erreger nutzen eine Vielfalt von Mechanismen, um in den MLN zu überleben. *S. typhimurium* überlebt intrazellulär in Makrophagen in den MLN, wo es bis zu einem Jahr post-inoculationem nachgewiesen werden kann (Monack, *et al.*, 2004). *Brucella suis* überlebt in Makrophagen, indem es die Apoptose inhibiert (Dornand, *et al.*, 2002). *Leishmania* spp. überleben in Granulomen in den MLN (Balada-Llasat, *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass *Y. pseudotuberculosis*-Mutanten, denen das T3SS fehlt, in MLN überleben können. Diese Mutanten provozierten eine Lymphadenitis mit kleinen Nekrosen, während der Wildtyp eine Lymphadenitis mit multiplen purulenten nekrotischen Herden provozierte. Sie zeigten, dass die Replikation in B- und T-Zell Gebieten auch T3SS-unabhängig möglich ist. Das Vorhandensein des T3SS führt zu vielen nekrotischen Läsionen und ermöglicht das Überleben in phagozytenreichen Gebieten und die Invasion anderer Organe (Balada-Llasat, *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Entzündungsmuster von bakteriellen Granulozytenreichen Abszessen entsprechen klassischen Beschreibungen von *Yersinia*-Abszessen in Peyerschen Plaques. Granulozyten als Teil der angeborenen Immunabwehr sind klassischerweise für die unspezifische Abwehr von Bakterien verantwortlich und haben hierfür Phagozytose-Eigenschaften. B-Zellen als Teil der spezifischen Abwehr sind für die Produktion von spezifischen Antikörpern zuständig. Initial bestehen *Y. enterocolitica*-Mikroabszesse in Maus-Leber und -Milz hauptsächlich aus Neutrophilen (Autenrieth, *et al.*, 1993b; Carter, 1975). In späteren Infektionsphasen, werden die Läsionen von mononukleären Zellen infiltriert und zeigen einen granulomatösen Charakter (Autenrieth, *et al.*, 1993b). Im Falle der in dieser Arbeit zum Teil gefundenen großen Abszesse mit nur geringem B-Zell-Nachweis in den Peyerschen Plaques, die von *yadA*-positiven WA-314-Varianten befallen sind, muss eine bakterieninduzierte Hemmung der B-Zell-Aktivierung diskutiert werden (siehe Abb.17 & 18). Es wurde im Mausmodell gezeigt, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für die Kontrolle einer *Y. enterocolitica*-Infektion notwendig sind. Dementsprechend können T-Zell-defiziente Mäuse *Y. enterocolitica* nicht kontrollieren und sterben an einer fulminanten Infektion. Die Übertragung von *Y. enterocolitica*-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in T-Zell-defiziente Mäuse vermittelt Schutz gegen *Y. enterocolitica*-Infektionen (Autenrieth, *et al.*, 1992; Autenrieth, *et al.*, 1993a). Es wurde gezeigt, dass eine *Y. enterocolitica*-Infektion die stimulatorische Kapazität einiger Subpopulationen dendritischer Zellen (DC) in vivo

negativ reguliert (Autenrieth, *et al.*, 2012). Dies führt zu unterschiedlicher Antigenaufnahme und -Abbau, Zytokinproduktion, Zellverlust und Zelltod in diversen DC-Populationen. Sie zeigten, dass diese Effekte direkt durch die Injektion von Yops in die DCs ausgelöst werden könnten und indirekt durch Beeinflussung der Homöostase von CD4⁺ und CD8 α DCs. Diese Prozesse könnten zu einer reduzierten T-Zell-Proliferation und der Immunevasion von *Y. enterocolitica* beitragen (Autenrieth, *et al.*, 2012). Eventuell könnten ähnliche Prozesse auch die B-Zell-Aktivierung hemmen.

4.3 Einfluss von Spezies-Unterschieden in YadA auf Zellinteraktion und Mausvirulenz

Die Ergebnisse der Adhärenz-, Invasions- und Mausinfektionsstudien in dieser Arbeit zeigten interessante Unterschiede zu den Ergebnissen von Heise & Dersch, 2006, die in einer Studie YadA_{pstb}-Varianten in *Y. pseudotuberculosis* untersucht hatten. Sie verglichen YadA-Varianten verschiedener *Y. pseudotuberculosis*-Serotypen und eine YadA-Mutante, mit Deletion eines kleinen Motivs in der YadA-Kopfregion. Dieses Motiv, das bei YadA_{pstb} im N-terminalen Bereich der Kopfregion zu finden ist, fehlt bei YadA_{ent}. Die Sequenzanalyse verschiedener YadA_{ent}-Varianten zeigte eine hohe Homologie zu der erstellten YadA_{pstb}-Deletionsmutante, woraufhin diese in o. g. Studie mit YadA_{ent} gleichgesetzt wurde (Heise, *et al.*, 2006). Es fand sich eine entscheidend verminderte Adhärenz an EZM-Proteine und Invasion in Hep-2-Zellen und eine 100-fach reduzierte Kolonisierungsfähigkeit der Deletionsmutante im oralen Mausinfektionsmodell. Hieraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass YadA_{pstb} stärker Adhärenz und Invasions vermittelnd sei als YadA_{ent}. In der Sequenzanalyse der Aminosäuren im N-terminalen Bereich der Kopf-Region fanden wir allerdings Unterschiede zwischen dieser Deletionsmutante und YadA_{ent}, die zu Ladungsänderungen führen und dadurch Unterschiede in Bindungs- und Virulenzeigenschaften bedingen könnten (siehe Abb.3). Die Unterschiede, welche sich in der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich mit den Ergebnissen von Heise und Dersch finden, könnten sich eventuell dadurch erklären lassen, dass die deutlichen Differenzen, welche Heise und Dersch in der Virulenzvermittlung durch verschiedene YadA-Varianten fanden, zumindest anteilig durch eine Fehlfaltung des von ihnen verwendeten YadA_{ent}-Pendants, welches eine YadA_{pstb}-Deletionskonstrukt ist, und einer daraus resultierenden geminderten Funktionalität zu erklären sind. Interessant ist auch die Feststellung, dass sich bei Heise und Dersch deutliche Unterschiede in YPIII abhängig von

der exprimierten YadA-Variante fanden, während sich in den hier vorliegenden Ergebnissen kein Unterschied zwischen dem Wildtyp YPIII (pIBI) und seiner *yadA*-Deletions-Mutante YPIII-C (pIBI::kan Δ *yadA*) findet. Es besteht die Möglichkeit, dass das von Heise und Dersch untersuchte YadA_{ent}-Analogon einen Virulenz hemmenden Effekt auf YPIII hatte, ähnlich den Ergebnissen von Versuchen mit *Y. pestis*, wonach dessen Virulenz durch die Komplementation mit einem funktionalen *yadA* gemindert wurde (Rosqvist, *et al.*, 1988).

4.3.1 Einfluss von YadA auf die Virulenz von *Y. pseudotuberculosis*

In der Auswertung der Oralinfektionsversuche von BALB/c-Mäusen mit den *Y. pseudotuberculosis*-Wildtyp-Stämmen YPIII und IP32953 und den jeweiligen *yadA*-knock-out-Mutanten zeigte sich kein Unterschied in der Mausvirulenz, was die Feststellung bestätigt, dass YadA für die Virulenz von *Y. pseudotuberculosis* nicht notwendig ist (Bolin, *et al.*, 1984; Han, *et al.*, 1997; Kapperud, *et al.*, 1987). Der Umstand, dass in den Gruppen der mit den *yadA*-negativen Mutanten infizierten Mäusen jeweils eine vor Ende des Versuchszeitraumes starb, könnte vermuten lassen, dass diese Stämme eventuell durch die *yadA*-Deletion sogar an Virulenz gewonnen haben. In Studien mit *Y. pseudotuberculosis* YPIII zeigte sich für eine *yadA*- und *inv*-negative Mutante ein stärkerer Leberbefall und eine effektivere Umgehung der Phagozytose verglichen mit dem Wildtyp. Umgekehrt zeigte eine *yadA*-positive Mutante eine stärkere Kolonisation von Lungengewebe (Hudson, *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse unterstützen das Modell, nachdem die gewebsspezifische Mikroumgebung, einschließlich ihres Gehalts an EZM-Proteinen und Immunzellrepertoires, eine wichtige Rolle spielt, inwiefern YadA und Invasin die bakterielle Persistenz vermitteln oder zu ihrer Abwehr führen (Hudson, *et al.*, 2006). Schon zuvor wurden Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus Zellkulturexperimenten und in vivo Experimenten an intaktem Gewebe erhoben, die den Einfluss der lokalen Umgebung auf die Wirtsantwort und auf die Erreger darstellen (Matzer, *et al.*, 2001).

Außerdem unterstützen die Ergebnisse von Hudson und Kollegen die Hypothese, dass der Verlust von YadA und Invasin in *Y. pestis* zu dessen höherer Virulenz beiträgt, indem er die Dissemination und die Evasion der Immunantwort in bestimmten Geweben erleichtert (Hudson, *et al.*, 2006). So ist bereits seit längerem bekannt, dass YadA die Mausvirulenz von *Y. pestis* reduziert, welches einen alternativen Komplement-Resistenzmechanismus entwickelt hat und somit nicht mehr auf YadA angewiesen ist (Bartra, *et al.*, 2008; Rosqvist, *et al.*, 1988). Die Sequenzierung von *Y. pestis* im Vergleich zu *Y. pseudotuberculosis* hat gezeigt,

dass *Y. pestis* durch Akkumulation von Pseudogenen, (wie inhibierte *yadA* und *inv* Gene) welche für den enterischen Lebensstil essentiell sind, und Aufnahme zwei weiterer Plasmide, sich phylogenetisch vor ca. 40 000 Jahren von *Y. pseudotuberculosis* abgespalten hat (Bliska, *et al.*, 1993; Chain, *et al.*, 2004; Rosqvist, *et al.*, 1988). Nach dem „use it or lose it“ Paradigma ist zu vermuten, dass die Gene abgeschaltet wurden, die nach Anpassung an einen neuen Lebenszyklus ohne enterale Phase nicht mehr gebraucht wurden (negative Selektion) (Chain, *et al.*, 2004; Strong, *et al.*, 2011). Die Abschaltung eines Gens kann zu pathoadaptiven Mutationen führen, wobei ein Genfunktionsverlust zu einer Virulenzsteigerung in einem bestimmten Wirtsmilieu führen kann (Hinchliffe, *et al.*, 2003).

4.4 Pathoadaptive Anpassung und neue Adhäsine

Der größere Unterschied in der Mausvirulenz zwischen den IP32953-Varianten und den YPIII-Varianten in dieser Arbeit anstelle eines bedeutenden Unterschieds zwischen den *yadA*-positiven und *yadA*-negativen Mutanten legt nahe, dass andere Faktoren im Virulenzfaktoren-Repertoire von *Y. pseudotuberculosis* einen bedeutenderen Einfluss auf Unterschiede im Infektionsverhalten der Serotypen haben könnten. So wurde vor kurzem ein neues Adhäsine in IP32953 entdeckt, das „intimin family protein“ (Ifp). Es ist Mitglied der Invasin/Intimin-Außenmembranadhäsine-Familie und zeigt signifikante Homologien der Aminosäuresequenz sowohl mit Invasin als auch mit Intimin („attaching and effacing protein“ von EPEC und EHEC). Es wurde gezeigt, dass es ein funktionelles Adhäsine ist, das unter anderem an HEp-2 Zellen bindet. Es wird in der späten log-Phase oder der frühen stationären Phase bei 37 °C exprimiert, gegenläufig zu dem Rückgang der Invasin-Expression bei dieser Temperatur (Strong, *et al.*, 2011). Ifp wird wahrscheinlich mit YadA koproduziert und könnte damit eine ähnliche Rolle wie YadA während der Infektion durch *Y. pseudotuberculosis* haben, eventuell für IP32953 sogar entscheidender sein als YadA (Eitel, *et al.*, 2002; Strong, *et al.*, 2011). Invasin und Intimin binden an $\beta 1$ (Frankel, *et al.*, 1996; Isberg, *et al.*, 1990; Sokurenko, *et al.*, 1999). Dies konnte für Ifp nicht gezeigt werden, was vermuten lässt, dass Ifp an einen anderen Rezeptor an der Zell-Oberfläche bindet (Strong, *et al.*, 2011). Die Funktionsweise von Ifp könnte eine Erklärung für die unveränderte Mausvirulenz von IP32953 nach *yadA*-knock-out sein. Eine andere Erklärung könnte in der Reaktion von *Y. pseudotuberculosis* auf Eisenmangel liegen. Eisen ist für Yersinien wie auch für andere Bakterien essentiell und es wurde berichtet, dass eine Yersinieninfektion in Patienten mit erhöhtem Serumeisen zu einem

schwereren Krankheitsverlauf führt (Boelaert, *et al.*, 1987). Allerdings konnte für *Y. pseudotuberculosis*, die unter Eisenmangelbedingungen angezüchtet wurden, eine höhere Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden, wie Polymyxin B, gezeigt werden. Dies entspricht der intestinalen Umgebungssituation nach oraler Infektion. Eines der regulierenden Gene wird bei niedrigem Eisengehalt in der Umgebung exprimiert und unterstützt die intestinale Kolonisierung. Dahingegen konnte dies für *Y. enterocolitica* nicht gezeigt werden (Arafah, *et al.*, 2009).

Eine andere Variante der patho-adaptiven Anpassung findet sich bei *Y. enterocolitica* Serotyp O:3. Die Expression und Funktion von oberflächenexponierten Virulenzfaktoren des *Y. enterocolitica* Serotyps O:3 unterscheiden sich signifikant von anderen *Y. enterocolitica* Serotypen wie etwa O:8 und O:9 (Uliczka, *et al.*, 2011). So wurde festgestellt, dass die Invasin-Expression des Serotyp O:3 auch bei 37 °C stark ausgeprägt ist, während sie bei anderen *Y. enterocolitica* Serotypen temperaturreguliert bei 37 °C stark reduziert wird. Weiter zeigte sich, dass die Co-Expression mit YadA und die Runterregulierung des O-Antigens bei 37 °C zu einer effizienten Internalisierung führten. Im Gegensatz hierzu ist die Expression des O-Antigens ein entscheidender Faktor für Serotyp O:8 bei 37 °C. Diese Unterschiede könnten einer Adaptation des Serotyps O:3 an den Darm von Schweinen entsprechen, die sein Hauptreservoir darstellen und eine Körpertemperatur von 39 °C bis 40 °C haben. Diese Anpassungen machen ihn auch für den Menschen hochpathogen, für den der Serotyp O:3 mittlerweile den häufigsten Erreger enteraler Yersiniosen darstellt. (Uliczka, *et al.*, 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass YadA in *Y. enterocolitica* WA-314 keine Invasivität zu vermitteln scheint, es aber entscheidend ist für die Zelladhärenz und den Erhalt der Mausvirulenz. Gleichzeitig zeigen sich in *Y. enterocolitica* WA-314 in der Mauspathogenität keine Vor- oder Nachteile in Abhängigkeit von der exprimierten YadA-Variante. Hingegen scheint YadA für die Mausvirulenz von *Y. pseudotuberculosis* nicht von entscheidender Relevanz zu sein, es könnte sogar ein Nachteil für das Überleben im Wirt nach Überwinden der Darmmukosa darstellen. Um die Bedeutung der Unterschiede in YadA besser verstehen zu können, sollten zukünftige Untersuchungen die untersuchten YadA-Varianten in *Y. pseudotuberculosis* vergleichen, um abzuwägen, welchen Vorteil YadA für diese Bakterien hat und ob der Vorteil der Zusatzdomänen in YadA_{pstb} in einer verminderten Kollagen-Bindung beruht.

5 Zusammenfassung

Die enteropathogenen *Yersinia*-Arten *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* verursachen neben Enteritiden und Enterokolitiden auch extraintestinale Erkrankungen wie reaktive Arthritis oder Erythema nodosum. In ihrem Infektionsverlauf zeigen sich allerdings zwischen diesen beiden Arten Unterschiede. So erfolgt eine Dissemination von *Y. pseudotuberculosis* meist in Form einer mesenterialen Lymphadenitis, im Falle von *Y. enterocolitica* hingegen kommt es zusätzlich zum Befall und zur Schädigung der weiter proximal und distal gelegenen Darmabschnitte im Sinne einer Enterokolitis. Bislang ist nicht geklärt, wodurch diese Unterschiede im Infektionsverlauf bedingt sind.

Das Virulenzplasmid der enteropathogenen Yersinien kodiert für verschiedene Virulenzfaktoren, unter anderem für das *Yersinia*-Adhäsın YadA. Zwischen den YadA-Varianten der beiden *Yersinia*-Spezies und ihrer Serovare finden sich Unterschiede in der Aminosäuresequenz, die als Ursache für Unterschiede im Bindungsverhalten der Bakterien an EZM-Proteine diskutiert werden. Da die Bindung an Wirtsgewebe einen entscheidenden Schritt in der Pathogenese einer bakteriellen Infektion darstellt, könnten diese Unterschiede in YadA verantwortlich für die unterschiedlichen Infektionsmuster sein.

Um dies zu klären, wurden *yadA*-Varianten und -Hybride aus beiden Arten in *Y. enterocolitica* Serotyp O:8, Stamm WA-314 als definiertem Expressionsprototyp eingebracht. Die verschiedenen Varianten wurden hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens an immobilisierte EZM-Proteine und ihr Adhärenz- und Invasionsverhalten an HeLa-Zellen untersucht. Hierbei fand sich eine signifikant stärkere Bindung von Mutanten mit einem YadA_{ent} an Kollagen I und Fibronektin. In der Adhärenz an HeLa-Zellen konnte dieser Unterschied nicht dargestellt werden, aber alle *yadA*-positiven Stämme zeigten eine stärkere Adhärenz als die *yadA*-negativen Kontroll-Mutante. Allerdings ließ sich kein Unterschied der Zellinvasivität in HeLa-Zellen verglichen mit der Negativkontrolle nachweisen.

Außerdem wurden zum Vergleich *yadA*-Knock-out-Mutanten von zwei *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen erstellt. Diese wurden gemeinsam mit ihren Wildtyp-Stämmen mit den o. g. genannten *Y. enterocolitica* WA-314-Mutanten im oralen Mausinfektionsmodell verglichen. Hierbei fand sich kein Unterschied in der Virulenz zwischen den *yadA*-positiven und *yadA*-negativen *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen. Hingegen war die *yadA*-Deletions-Mutante von *Y. enterocolitica* WA-314 nicht mausvirulent im Gegensatz zu den *yadA*-positiven *Y. enterocolitica* WA-314-Mutanten.

Die Ergebnisse der histologischen Auswertung von Milz und Peyerschen Plaques weisen auf einen unterschiedlichen Infektionsverlaufs von *Y. enterocolitica* im Vergleich zu *Y. pseudotuberculosis* hin. Allerdings zeigte sich auch hier, dass Unterschiede im Infektionserlauf für *Y. enterocolitica* WA-314 im Mausmodell nicht von der exprimierten YadA-Variante abhängig sind.

Es zeigte sich, dass das *yadA*-Gen von verschiedenen *Yersinia*-Spezies, Serotypen und Stämmen nach Übertragung auf *Y. enterocolitica* WA-314 im vergleichenden Mausinfektionsmodell keinen Virulenzunterschied deutlich machte. Zudem konnte die Kopfregion, unter Nutzung der homologen Sequenzen im Konnektor-Bereich, ohne Virulenzminderung ausgetauscht werden.

Zudem zeigte sich in dieser Arbeit, in Einklang mit Erkenntnissen, wonach die Kopfregion die EZM-Bindung vermittelt, dass nach einem solchen Austausch das Bindungsverhalten an Kollagen I und Fibronektin durch die Kopfregion bestimmt wurde. Die Analyse der Adhärenz an HeLa-Zellen zeigte allerdings, dass eine stärkere Kollagen I- und Fibronektin-Bindung nicht mit einer stärkeren Zellbindung einhergeht und somit kein ausreichender Prediktor für die Zellbindungsfähigkeit ist.

Die Auswertung der Mausinfektionsversuche bestätigen, dass YadA für die Virulenz von *Y. enterocolitica* entscheidend ist, wohingegen *Y. pseudotuberculosis* auch ohne YadA seine volle Mausvirulenz behält. YadA, das für *Y. enterocolitica* ein wichtiger Virulenzfaktor ist, kann unter gewissen Voraussetzungen, wie für *Y. pestis* nachgewiesen, auch nachteilhaft für das Überleben im Wirt sein. Für *Y. pseudotuberculosis* könnten andere Virulenzfaktoren eine wichtigere Rolle spielen als YadA.

6 Literaturverzeichnis

- Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A and Carniel E (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 14043-14048
- Ackermann N (2005). "Das Yersinia-Adhäsion YadA, ein oligomerer Autotransporter als Prototyp der Oca-Familie – eine molekulare Struktur und Funktionsanalyse" (*Dissertation*). Max-von-Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Ackermann N, Tiller M, Anding G, Roggenkamp A and Heesemann J (2008). Contribution of trimeric autotransporter C-terminal domains of oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family members YadA, UspA1, EibA, and Hia to translocation of the YadA passenger domain and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **190**(14): 5031-5043
- Aepfelbacher M, Zumbühl R, Ruckdeschel K, Jacobi CA, Barz C and Heesemann J (1999). The tranquilizing injection of Yersinia proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. *Biol Chem* **380**(7-8): 795-802
- Aleksic S and Bockemühl J (1990). [Microbiology and epidemiology of Yersinia infections]. *Immun Infekt* **18**(6): 178-185
- Aleksic S, Bockemühl J and Wuthe HH (1995). Epidemiology of *Y. pseudotuberculosis* in Germany, 1983-1993. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 55-58
- Arafah S, Rosso ML, Rehaume L, Hancock RE, Simonet M and Marceau M (2009). An iron-regulated LysR-type element mediates antimicrobial peptide resistance and virulence in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology* **155**(Pt 7): 2168-2181
- Autenrieth IB, Tingle A, Reske-Kunz A and Heesemann J (1992). T lymphocytes mediate protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cell clones specific for *Y. enterocolitica*. *Infect Immun* **60**(3): 1140-1149
- Autenrieth IB, Hantschmann P, Heymer B and Heesemann J (1993a). Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiology* **187**(1-2): 1-16
- Autenrieth IB, Vogel U, Preger S, Heymer B and Heesemann J (1993b). Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect Immun* **61**(6): 2585-2595
- Autenrieth IB and Firsching R (1996). Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol* **44**(4): 285-294
- Autenrieth SE, Warnke P, Wabnitz GH, et al. (2012). Depletion of dendritic cells enhances innate anti-bacterial host defense through modulation of phagocyte homeostasis. *PLoS Pathog* **8**(2): e1002552
- Avery L (2007). "Mann-Whitney U Test" (*webpage*). Last accessed: 18.03.2011 (at <http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>)
- Balada-Llasat JM and Mecsas J (2006). Yersinia has a tropism for B and T cell zones of lymph nodes that is independent of the type III secretion system. *PLoS Pathog* **2**(9): e86
- Balligand G, Laroche Y and Cornelis G (1985). Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect Immun* **48**(3): 782-786

- Barenkamp SJ and Leininger E (1992). Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **60**(4): 1302-1313
- Barnes PD, Bergman MA, Mecsas J and Isberg RR (2006). *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *J Exp Med* **203**(6): 1591-1601
- Bartra SS, Styer KL, O'Bryant DM, *et al.* (2008). Resistance of *Yersinia pestis* to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein. *Infect Immun* **76**(2): 612-622
- Benz I and Schmidt MA (1992). AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* **6**(11): 1539-1546
- Biedzka-Sarek M, Jarva H, Hyytiäinen H, Meri S and Skurnik M (2008). Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun* **76**(9): 4100-4109
- Bliska JB and Falkow S (1992). Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8): 3561-3565
- Bliska JB, Copass MC and Falkow S (1993). The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect Immun* **61**(9): 3914-3921
- Bliska JB and Black DS (1995). Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect Immun* **63**(2): 681-685
- Bockemühl J and Roggentin P (2004). [Intestinal yersiniosis. Clinical importance, epidemiology, diagnosis, and prevention]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **47**(7): 685-691
- Boelaert JR, van Landuyt HW, Valcke YJ, *et al.* (1987). The role of iron overload in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* bacteremia in hemodialysis patients. *J Infect Dis* **156**(2): 384-387
- Bolin I and Wolf-Watz H (1984). Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **43**(1): 72-78
- Bottone EJ (1977). *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Crit Rev Microbiol* **5**(2): 211-241
- Bottone EJ (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**(2): 257-276
- Bottone EJ (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* **1**(4): 323-333
- Brenner DJ (1979). Speciation in *Yersinia*. *Contrib Microbiol Immunol* **5**: 33-43
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, *et al.* (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**(5663): 1532-1535
- Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, *et al.* (2006). DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**(4): 396-400

- Bukholm G, Kapperud G and Skurnik M (1990). Genetic evidence that the yopA gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon. *Infect Immun* **58**(7): 2245-2251
- Butler T, de Almeida CR, de Almeida AP, *et al.* (1980). [Serological and experimental studies of plague in Northeastern Brazil]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* **32**: 26-35
- Carniel E, Guiyoule A, Guilvout I and Mercereau-Puijalon O (1992). Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the irp2 gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol Microbiol* **6**(3): 379-388
- Carniel E, Guilvout I and Prentice M (1996). Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **178**(23): 6743-6751
- Carter PB (1975). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect Immun* **11**(1): 164-170
- Casutt-Meyer S, Renzi F, Schmalzer M, Jann NJ, Amstutz M and Cornelis GR (2010). Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword. *PLoS One* **5**(12): e15159
- Chain PS, Carniel E, Larimer FW, *et al.* (2004). Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(38): 13826-13831
- Chambers CE and Sokol PA (1994). Comparison of siderophore production and utilization in pathogenic and environmental isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* **32**(1): 32-39
- Chandler ND and Parisi MT (1994). Radiological case of the month. *Yersinia enterocolitica* masquerading as appendicitis. *Arch Pediatr Adolesc Med* **148**(5): 527-528
- Chang AC and Cohen SN (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**(3): 1141-1156
- Clark MA, Hirst BH and Jepson MA (1998). M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**(3): 1237-1243
- Comanducci M, Bambini S, Brunelli B, *et al.* (2002). NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* **195**(11): 1445-1454
- Cornelis G, Laroche Y, Balligand G, Sory MP and Wauters G (1987). *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev Infect Dis* **9**(1): 64-87
- Cornelis GR and Wolf-Watz H (1997). The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**(5): 861-867
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, *et al.* (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1315-1352
- Cornelis GR (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(10): 742-752
- Cotter SE, Surana NK and St Geme JW, 3rd (2005). Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **13**(5): 199-205
- Cover TL and Aber RC (1989). *Yersinia enterocolitica*. *N Engl J Med* **321**(1): 16-24
- Datsenko KA and Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6640-6645

- Dautin N and Bernstein HD (2007). Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**: 89-112
- de Koning-Ward TF, Ward AC, Hartland EL and Robins-Browne RM (1995). The urease complex gene of *Yersinia enterocolitica* and its role in virulence. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 262-263
- Delor I, Kaeckenbeeck A, Wauters G and Cornelis GR (1990). Nucleotide sequence of yst, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infect Immun* **58**(9): 2983-2988
- Delor I and Cornelis GR (1992). Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**(10): 4269-4277
- Didierlaurent A, Sirard JC, Kraehenbuhl JP and Neutra MR (2002). How the gut senses its content. *Cell Microbiol* **4**(2): 61-72
- Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J and Liautard JP (2002). The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol* **90**(1-4): 383-394
- Dörries R and Hof H (2004). *Yersinia*. In: Bob A and Bob K (Hrsg.). *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*, 3 Aufl., by Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S. 390-395
- Eitel J and Dersch P (2002). The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasion is repressed. *Infect Immun* **70**(9): 4880-4891
- El Tahir Y and Skurnik M (2001). YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol* **291**(3): 209-218
- Elkins C, Morrow KJ, Jr. and Olsen B (2000). Serum resistance in *Haemophilus ducreyi* requires outer membrane protein DsrA. *Infect Immun* **68**(3): 1608-1619
- Ell SR (1984). Immunity as a factor in the epidemiology of medieval plague. *Rev Infect Dis* **6**(6): 866-879
- Emody L, Heesemann J, Wolf-Watz H, *et al.* (1989). Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol* **171**(12): 6674-6679
- Fink DL, Cope LD, Hansen EJ and Geme JW, 3rd (2001). The *Hemophilus influenzae* Hap autotransporter is a chymotrypsin clan serine protease and undergoes autoproteolysis via an intermolecular mechanism. *J Biol Chem* **276**(42): 39492-39500
- Finlay BB and Cossart P (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**(5313): 718-725
- Flügel A, Schulze-Koops H, Heesemann J, *et al.* (1994). Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J Biol Chem* **269**(47): 29732-29738
- Forsberg A, Viitanen AM, Skurnik M and Wolf-Watz H (1991). The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **5**(4): 977-986
- Frankel G, Lider O, HersHKoviz R, *et al.* (1996). The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem* **271**(34): 20359-20364
- Galan JE and Wolf-Watz H (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**(7119): 567-573

- Garrity GM, Bell JA and Lilburn TG (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes Release 5.0, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition. S.124
- Giannasca PJ, Giannasca KT, Falk P, Gordon JI and Neutra MR (1994). Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines. *Am J Physiol* **267**(6 Pt 1): G1108-1121
- Gigli I, Fujita T and Nussenzweig V (1979). Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(12): 6596-6600
- GraphPad Software I (2002-2005). "GraphPad QuickCalcs: t test calculator" (webpage). Last accessed: (at <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=C>)
- Gripenberg-Lerche C, Zhang L, Ahtonen P, Toivanen P and Skurnik M (2000). Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and o:8: role of urease in virulence and arthritogenicity. *Infect Immun* **68**(2): 942-947
- Grutzkau A, Hanski C, Hahn H and Riecken EO (1990). Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**(9): 1011-1015
- Hamburger ZA, Brown MS, Isberg RR and Bjorkman PJ (1999). Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**(5438): 291-295
- Han YW and Miller VL (1997). Reevaluation of the virulence phenotype of the inv yadA double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **65**(1): 327-330
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4): 557-580
- Handley SA, Dube PH, Revell PA and Miller VL (2004). Characterization of oral *Yersinia enterocolitica* infection in three different strains of inbred mice. *Infect Immun* **72**(3): 1645-1656
- Handley SA, Newberry RD and Miller VL (2005). *Yersinia enterocolitica* invasin-dependent and invasin-independent mechanisms of systemic dissemination. *Infect Immun* **73**(12): 8453-8455
- Hanski C, Kutschka U, Schmoranz HP, *et al.* (1989a). Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect Immun* **57**(3): 673-678
- Hanski C, Naumann M, Hahn H and Riecken EO (1989b). Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. An in vivo study. *Med Microbiol Immunol* **178**(5): 289-296
- Harrison TR, Fauci AS, Braunwald E and Isselbacher KJ (1998). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, by McGraw-Hill Professional, New York
- Heesemann J and Gaede K (1989). Mechanisms involved in the pathogenesis of *Yersinia* infections. *Rheumatol Int* **9**(3-5): 213-217
- Heesemann J (1991). [Diagnosis of infections with gene technology methods: an increased value of miasmata?]. *Immun Infekt* **19**(5): 137
- Heesemann J, Hantke K, Vocke T, *et al.* (1993). Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol Microbiol* **8**(2): 397-408
- Heesemann J (2001). Die Gattung *Yersinia*. In: W. K, *et al.* (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie*, 8 Aufl., by Urban & Fischer Verlag, München Jena. S. 315-328

- Heesemann J, Sing A and Trülsch K (2006). *Yersinia's* stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* **9**(1): 55-61
- Heesemann J and Ackermann N (2007). Charakterisierung der infektionsbiologischen Rolle des *Yersinia*-Adhäsins YadA von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* - Projektvorschlag für das Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Heesemann J, Grüter L. (1987). Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **40**: 37-41
- Heise T and Dersch P (2006). Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9): 3375-3380
- Henderson IR, Navarro-Garcia F and Nataro JP (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**(9): 370-378
- Henderson IR and Nataro JP (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**(3): 1231-1243
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC and Ala'Aldeen D (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(4): 692-744
- Herold G (2011). Yersiniose. In: Herold G (Hrsg.). *Innere Medizin*, by Gerd Herold, Köln. S. 840-841
- Hildebrandt H, Dornblüth O and Pschyrembel W (1993). *Yersinia*. In: Hildebrandt H, Dornblüth O and Pschyrembel W (Hrsg.). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 257 Aufl., by Walter de Gruyter GmbH, Berlin. S. 1679
- Hinchliffe SJ, Isherwood KE, Stabler RA, *et al.* (2003). Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Res* **13**(9): 2018-2029
- Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A and Heesemann J (2000). Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**(22): 5989-5999
- Hoiczky E and Blobel G (2001). Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4669-4674
- Holmstrom A, Petterson J, Rosqvist R, *et al.* (1997). YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol Microbiol* **24**(1): 73-91
- Hoogkamp-Korstanje JA (1987). Antibiotics in *Yersinia enterocolitica* infections. *J Antimicrob Chemother* **20**(1): 123-131
- Hudson KJ and Bouton AH (2006). *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins regulate tissue-specific colonization and immune cell localization in a mouse model of systemic infection. *Infect Immun* **74**(11): 6487-6490
- Iriarte M, Vanooteghem JC, Delor I, Diaz R, Knutton S and Cornelis GR (1993). The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **9**(3): 507-520

- Isberg RR, Swain A and Falkow S (1988). Analysis of expression and thermoregulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* inv gene with hybrid proteins. *Infect Immun* **56**(8): 2133-2138
- Isberg RR (1989). Determinants for thermoinducible cell binding and plasmid-encoded cellular penetration detected in the absence of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *Infect Immun* **57**(7): 1998-2005
- Isberg RR and Leong JM (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**(5): 861-871
- Isberg RR and Barnes P (2000). Border patrols and secret passageways across the intestinal epithelium. *Trends Microbiol* **8**(7): 291-293
- Jackson MW and Plano GV (2000). Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* **186**(1): 85-90
- Jacob-Dubuisson F, Loch C and Antoine R (2001). Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**(2): 306-313
- Jacob-Dubuisson F, Fernandez R and Coutte L (2004). Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 235-257
- Jouve M, Garcia MI, Courcoux P, Labigne A, Gounon P and Le Bouguenec C (1997). Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the afa-3 gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. *Infect Immun* **65**(10): 4082-4089
- Kapperud G, Namork E and Skarpeid HJ (1985). Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **47**(2): 561-566
- Kapperud G and Namork E (1987). Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. Correlation with outer membrane protein YOP1, autoagglutination, and hemagglutination. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 165-172
- Kerschen EJ, Cohen DA, Kaplan AM and Straley SC (2004). The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun* **72**(8): 4589-4602
- Kim DS, Chao Y and Saier MH, Jr. (2006). Protein-translocating trimeric autotransporters of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **188**(16): 5655-5667
- Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M, Blom AM, Skurnik M and Meri S (2008). *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* **4**(8)
- Klemm P (1994). *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines*, by CRC Press, Inc. , Boca Raton, Fla.
- Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H and Pulverer G (2001). *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Aufl., by Urban & Fischer Verlag, München Jena. S. 323-328
- Koretke KK, Szczesny P, Gruber M and Lupas AN (2006). Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *J Struct Biol* **155**(2): 154-161
- Kraehenbuhl JP and Neutra MR (2000). Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 301-332

- Lambert de Rouvroit C, Sluiter C and Cornelis GR (1992). Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **6**(3): 395-409
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, *et al.* (2007). "ClustalW and ClustalX version 2" (*webpage*). Last accessed: 12.08.2012 (at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)
- Lee LA, Gerber AR, Lonsway DR, *et al.* (1990). *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N Engl J Med* **322**(14): 984-987
- Lindler LE, Klempner MS and Straley SC (1990). *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. *Infect Immun* **58**(8): 2569-2577
- Lindler LE (2009). Typing methods for the plague pathogen, *Yersinia pestis*. *J AOAC Int* **92**(4): 1174-1183
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275
- Mantle M, Basaraba L, Peacock SC and Gall DG (1989). Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect Immun* **57**(11): 3292-3299
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL and Tolbert NE (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**(1): 206-210
- Matzer SP, Baumann T, Lukacs NW, Rollinghoff M and Beuscher HU (2001). Constitutive expression of macrophage-inflammatory protein 2 (MIP-2) mRNA in bone marrow gives rise to peripheral neutrophils with preformed MIP-2 protein. *J Immunol* **167**(8): 4635-4643
- Mayer-Scholl A, Averhoff P and Zychlinsky A (2004). How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* **7**(1): 62-66
- Mecenas J, Bilis I and Falkow S (2001). Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of an orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **69**(5): 2779-2787
- Mikulskis AV, Delor I, Thi VH and Cornelis GR (1994). Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol Microbiol* **14**(5): 905-915
- Mills SD, Boland A, Sory MP, *et al.* (1997). *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12638-12643
- Monack DM, Bouley DM and Falkow S (2004). *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med* **199**(2): 231-241
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273
- Nagel G, Lahrz A and Dersch P (2001). Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol* **41**(6): 1249-1269

- Nägele V (2010). "Funktionelle Charakterisierung trimerer Autotransporteradhäsine von *Neisseria meningitidis* (NadA) und *Yersinia enterocolitica* (YadA)" (Dissertation). Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Technische Universität, München
- Nakajima R, Motin VL and Brubaker RR (1995). Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect Immun* **63**(8): 3021-3029
- Nathan C (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**(3): 173-182
- Neutra MR, Frey A and Kraehenbuhl JP (1996). Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**(3): 345-348
- Neutra MR (1999). M cells in antigen sampling in mucosal tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* **236**: 17-32
- Nummelin H, Merckel MC, Leo JC, Lankinen H, Skurnik M and Goldman A (2004). The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J* **23**(4): 701-711
- Oellerich MF, Jacobi CA, Freund S, *et al.* (2007). *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun* **75**(8): 3802-3811
- Oomen CJ, van Ulsen P, van Gelder P, Feijen M, Tommassen J and Gros P (2004). Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J* **23**(6): 1257-1266
- Paerregaard A, Espersen F, Jensen OM and Skurnik M (1991). Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* **59**(1): 253-260
- Papanikou E, Karamanou S and Economou A (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* **5**(11): 839-851
- Pepe JC and Miller VL (1993). *Yersinia enterocolitica* invasins: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14): 6473-6477
- Pepe JC, Badger JL and Miller VL (1994). Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* inv gene. *Mol Microbiol* **11**(1): 123-135
- Pepe JC, Wachtel MR, Wagar E and Miller VL (1995). Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* **63**(12): 4837-4848
- Perry RD and Fetherston JD (1997). *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**(1): 35-66
- Perry RD, Balbo PB, Jones HA, Fetherston JD and DeMoll E (1999). Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology* **145** (Pt 5): 1181-1190
- Pierson DE and Falkow S (1993). The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect Immun* **61**(5): 1846-1852
- Pilz D, Vocke T, Heesemann J and Brade V (1992). Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infect Immun* **60**(1): 189-195
- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K and Meyer TF (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**(6103): 458-462

- Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, *et al.* (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1528-1533
- Putzker M, Sauer H and Sobe D (2001). Plague and other human infections caused by *Yersinia* species. *Clin Lab* **47**(9-10): 453-466
- Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, Rappuoli R and Falkow S (1989). Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2637-2641
- Revell PA and Miller VL (2001). *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett* **205**(2): 159-164
- Robert-Koch-Institut (2011). *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010*, by Abteilung für Infektionsepidemiologie, Robert-Koch-Institut, Berlin
- Robins-Browne RM, Cianciosi S, Bordun AM and Wauters G (1991). Pathogenicity of *Yersinia kristensenii* for mice. *Infect Immun* **59**(1): 162-167
- Roggenkamp A, Neuberger HR, Flügel A, Schmoll T and Heesemann J (1995a). Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**(6): 1207-1219
- Roggenkamp A, Schubert S, Jacobi CA and Heesemann J (1995b). Dissection of the *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid pYVO8 into an operating unit and virulence gene modules. *FEMS Microbiol Lett* **134**(1): 69-73
- Roggenkamp A, Ruckdeschel K, Leitritz L, Schmitt R and Heesemann J (1996). Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* **64**(7): 2506-2514
- Roggenkamp A, Ackermann N, Jacobi CA, Truelzsch K, Hoffmann H and Heesemann J (2003). Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* **185**(13): 3735-3744
- Rosqvist R, Skurnik M and Wolf-Watz H (1988). Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature* **334**(6182): 522-524
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S and Heesemann J (1996). Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* **64**(3): 724-733
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491
- Sandt CH and Hill CW (2000). Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**(4): 2205-2214
- Scavizzi MR, Gayraud M, Hornstein MJ, Jupeau-Vessieres AM, Bronner FD and Elbhar A (1996). In-vitro and in-vivo activities of antibiotics on *Yersinia enterocolitica*. *J Antimicrob Chemother* **38**(6): 1108-1109
- Schaffner A (1999). Enterokolitis durch Yersinien. In: Alexander K, *et al.* (Hrsg.). *TIM, Thieme's Innere Medizin*, 1 Aufl., by Thieme, Stuttgart. S. 498
- Scherer WF, Syverton JT and Gey GO (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**(5): 695-710

- Schiemann DA (1979). Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can J Microbiol* **25**(11): 1298-1304
- Schmid Y, Grassl GA, Bühler OT, Skurnik M, Autenrieth IB and Bohn E (2004). *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. *Infect Immun* **72**(12): 6780-6789
- Schulze-Koops H, Burkhardt H, Heesemann J, von der Mark K and Emmrich F (1992). Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect Immun* **60**(6): 2153-2159
- Selbitz H-J (2001). *Yersinia*. In: Rolle A and Mayr A (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7 Aufl., by Enke, Stuttgart. S. 478-481
- Shayegani M, DeForge I, McGlynn DM and Root T (1981). Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *J Clin Microbiol* **14**(3): 304-312
- Sim E, Wood AB, Hsiung LM and Sim RB (1981). Pattern of degradation of human complement fragment, C3b. *FEBS Lett* **132**(1): 55-60
- Simonet M, Richard S and Berche P (1990). Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect Immun* **58**(3): 841-845
- Simonet M, Riot B, Fortineau N and Berche P (1996). Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the inv gene. *Infect Immun* **64**(1): 375-379
- Sinclair JF, Dean-Nystrom EA and O'Brien AD (2006). The established intimin receptor Tir and the putative eucaryotic intimin receptors nucleolin and beta1 integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes in vivo. *Infect Immun* **74**(2): 1255-1265
- Sing A, Roggenkamp A, Geiger AM and Heesemann J (2002). *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol* **168**(3): 1315-1321
- Skurnik M, Bolin I, Heikkinen H, Piha S and Wolf-Watz H (1984). Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* **158**(3): 1033-1036
- Skurnik M and Wolf-Watz H (1989). Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**(4): 517-529
- Skurnik M and Toivanen P (1992). LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **174**(6): 2047-2051
- Skurnik M, Peippo A and Ervela E (2000). Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol* **37**(2): 316-330
- Smego RA, Frean J and Koornhof HJ (1999). Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**(1): 1-15
- Sokurenko EV, Hasty DL and Dykhuizen DE (1999). Pathoadaptive mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens. *Trends Microbiol* **7**(5): 191-195

- Sory MP, Tollenare J, Laszlo C, Biot T, Cornelis GR and Wauters G (1990). Detection of pYV+ *Yersinia enterocolitica* isolates by P1 slide agglutination. *J Clin Microbiol* **28**(11): 2403-2408
- St Geme JW, 3rd and Cutter D (2000). The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol* **182**(21): 6005-6013
- Strong PC, Hinchliffe SJ, Patrick H, Atkinson S, Champion OL and Wren BW (2011). Identification and characterisation of a novel adhesin Ifp in *Yersinia pseudotuberculosis*. *BMC Microbiol* **11**: 85
- Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH and Itakura K (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(11): 6613-6617
- Surana NK, Cutter D, Barenkamp SJ and St Geme JW, 3rd (2004). The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* **279**(15): 14679-14685
- Svanborg C, Ørskov F and Ørskov I (1994). Fimbriae and disease. In: Klemm P (Hrsg.). *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines*, by CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. S. 239-254
- Szczesny P and Lupas A (2008). Domain annotation of trimeric autotransporter adhesins--daTAA. *Bioinformatics* **24**(10): 1251-1256
- Tahir YE, Kuusela P and Skurnik M (2000). Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification Of eight NSVAIG - S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. *Mol Microbiol* **37**(1): 192-206
- Tamm A, Tarkkanen AM, Korhonen TK, Kuusela P, Toivanen P and Skurnik M (1993). Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **10**(5): 995-1011
- Tauxe RV, Vandepitte J, Wauters G, et al. (1987). *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* **1**(8542): 1129-1132
- Terti R, Skurnik, M., Vartio, T., Kuusela, P. (1992). Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect. Immun.* **60**: 3021-3024
- Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J and Heesemann J (1998). Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* **36**(9): 2557-2564
- Uliczka F, Pisano F, Schaake J, et al. (2011). Unique cell adhesion and invasion properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most frequent cause of human Yersiniosis. *PLoS Pathog* **7**(7): e1002117
- Veiga E, Sugawara E, Nikaido H, de Lorenzo V and Fernandez LA (2002). Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *EMBO J* **21**(9): 2122-2131
- Visser LG, Hiemstra PS, van den Barselaar MT, Ballieux PA and van Furth R (1996). Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect Immun* **64**(5): 1653-1658
- Vogel U, Autenrieth IB, Berner R and Heesemann J (1993). Role of plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* in humoral immunity against secondary *Y. enterocolitica* infection in mice. *Microb Pathog* **15**(1): 23-36

- Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M and Tommassen J (2003). Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**(5604): 262-265
- Voulhoux R and Tommassen J (2004). Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res Microbiol* **155**(3): 129-135
- Wachtel MR and Miller VL (1995). In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **63**(7): 2541-2548
- Wartha F, Beiter K, Albiger B, *et al.* (2007). Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* **9**(5): 1162-1171
- Wauters G, Kandolo K and Janssens M (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 14-21
- Wauters G, Aleksic S, Charlier J and Schulze G (1991). Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. *Contrib Microbiol Immunol* **12**: 239-243
- Weber K and Osborn M (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**(16): 4406-4412
- Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro SD, Weiss J and Zychlinsky A (2002). Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* **417**(6884): 91-94
- Whaley K and Ruddy S (1976). Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein distinct from C3b inactivator. *Science* **193**(4257): 1011-1013
- Wollmann P, Zeth K, Lupas AN and Linke D (2006). Purification of the YadA membrane anchor for secondary structure analysis and crystallization. *Int J Biol Macromol* **39**(1-3): 3-9
- Wren BW (2003). The *yersiniae*--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **1**(1): 55-64
- Yersin A (1894). La peste bubonique à Hong Kong. *Ann. Inst. Pasteur Paris* **8**: 662-667
- Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP and Stewart AF (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* **20**(2): 123-128
- Zhang Y, Muyrers JP, Testa G and Stewart AF (2000). DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **18**(12): 1314-1317

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
Ail	engl.: attachment invasive locus
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
bpp	Basenpaarposition
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CFU	engl.: colony-forming units
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
Cm	Chloramphenicol
CuSO ₄ *5H ₂ O	Kupfer (II) Sulfat
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
EZM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FKS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
Gen	Gentamicin
GM-CSF	engl.: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
H ₂ Odest.	einfach destilliertes Wasser
H ₂ Obidest.	doppelt destilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
Inv	Invasin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropylthio- β -galactosid
KAc	Kaliumacetat
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LD50	Infektionsdosis, die für 50% der Versuchstiere letal ist
M	Molar (mol/l)
m	milli
MCP	engl.: monocyte chemoattractant protein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	engl.: multiplicity of infection
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Myf	engl.: mucoid yersinia fibrillae
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaMOPS	Natriumsalz der 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
NET	neutrophil extracellular traps
Neg-K	Negativ-Kontrolle
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OMP	engl.: outer membrane protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PBST	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung mit Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PNM	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
rpm	engl.: rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
Spec	Spectinomycin
T3SS	Typ-3 Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
TM	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit (Enzymeinheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
V	Volt
(w/v)	Gewichtsanteil
(w/w)	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
YadA	engl.: Yersinia adhesin A
YadA _{ent}	YadA aus <i>Y. enterocolitica</i>
YadA _{pbst}	YadA aus <i>Y. pseudotuberculosis</i>
Yops	engl.: Yersinia outer proteins
z. B.	zum Beispiel

7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2007 bis September 2012 am Max von Pettenkofer-Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt. Sie wurde im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare und Systembiologische Medizin“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre erstellt. Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Max von Pettenkofer-Institut durchführen zu können, für die interessante Aufgabenstellung, die engagierte Betreuung und die kontinuierliche Förderung dieses Projekts.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. Nikolaus Ackermann für die viele Zeit, die er sich für mich und meine Arbeit in seiner Rolle als mein Betreuer genommen hat, und für die große Hilfe, die er mir bei der Bearbeitung des Themas gewesen ist.

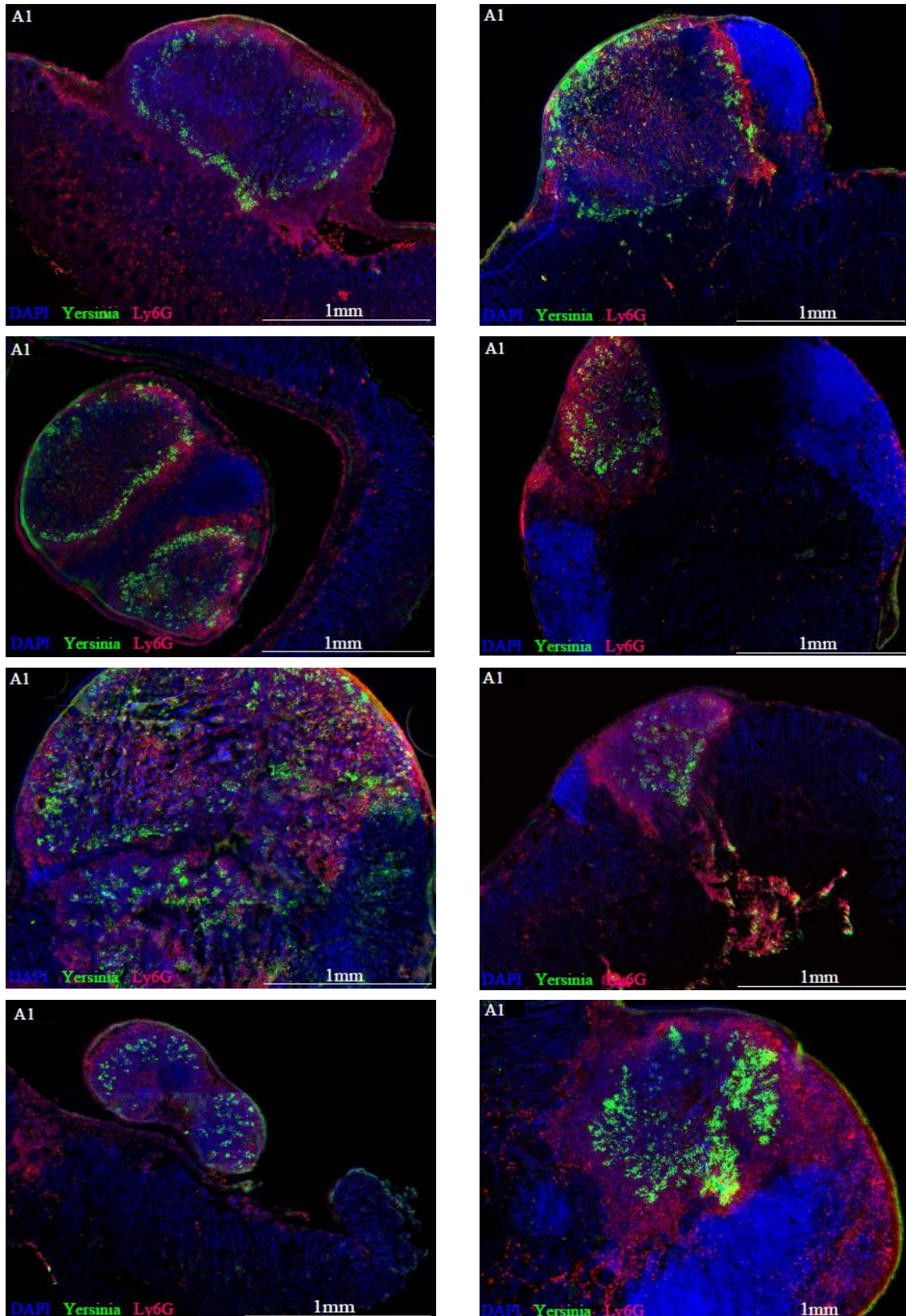
Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Frau Gisela Anding bedanken für ihre stets tatkräftige Hilfsbereitschaft und ihr großes Engagement mich an ihrem methodischen Wissensschatz teilhaben zu lassen.

Außerdem danke ich Virginie Nägele, Stefan Wölke, Anette Schulz und Katja Vlasova für die fachliche und moralische Unterstützung. Ebenso danke ich all den anderen hilfsbereiten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Max-von-Pettenkofer-Instituts.

Für ihre stete und liebevolle Unterstützung und die Ermöglichung meiner gesamten Ausbildung, einschließlich dieser Arbeit, möchte ich meinen Eltern von ganzem Herzen danken. Auch meiner Schwester Verena und meinen „Münchnern“, besonders Denise Buchner, Annegret Kamp, Alina Steppner, Barbara Vaerst und Lucia Laugwitz, möchte ich danken, dass sie mich auch bei Rückschlägen und Enttäuschungen in diesen Jahren immer bestärkt und unterstützt haben.

7.3 Bilder

7.3.1 Peyersche Plaques



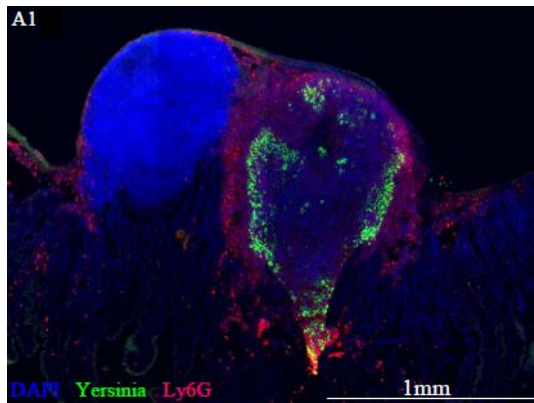


Abb.29: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Peyerschen Plaques infiziert mit WA-C (pYV-A1)

Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-A1). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

A1 = pYV-A1 in WA-C.

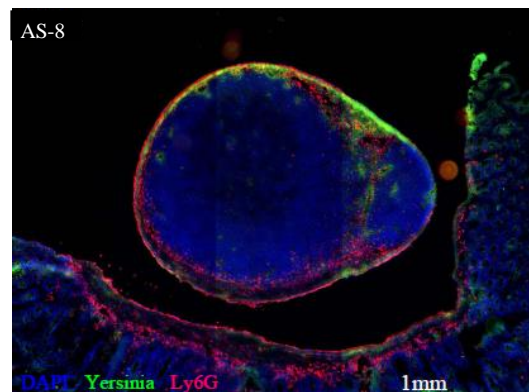
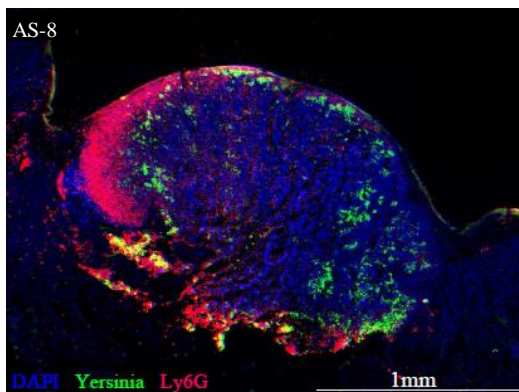


Abb.30: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Peyerschen Plaques infiziert mit WA-C (pYV-AS-8)

Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS-8). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

AS-8 = pYV-AS-8 in WA-C.

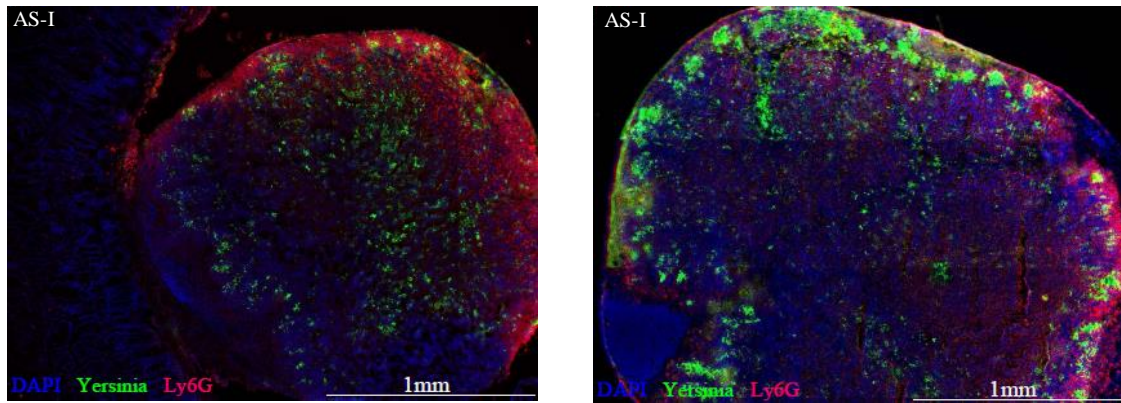


Abb.31: Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-AS-I)

Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS-I). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

AS-I = pYV-AS-I in WA-C.

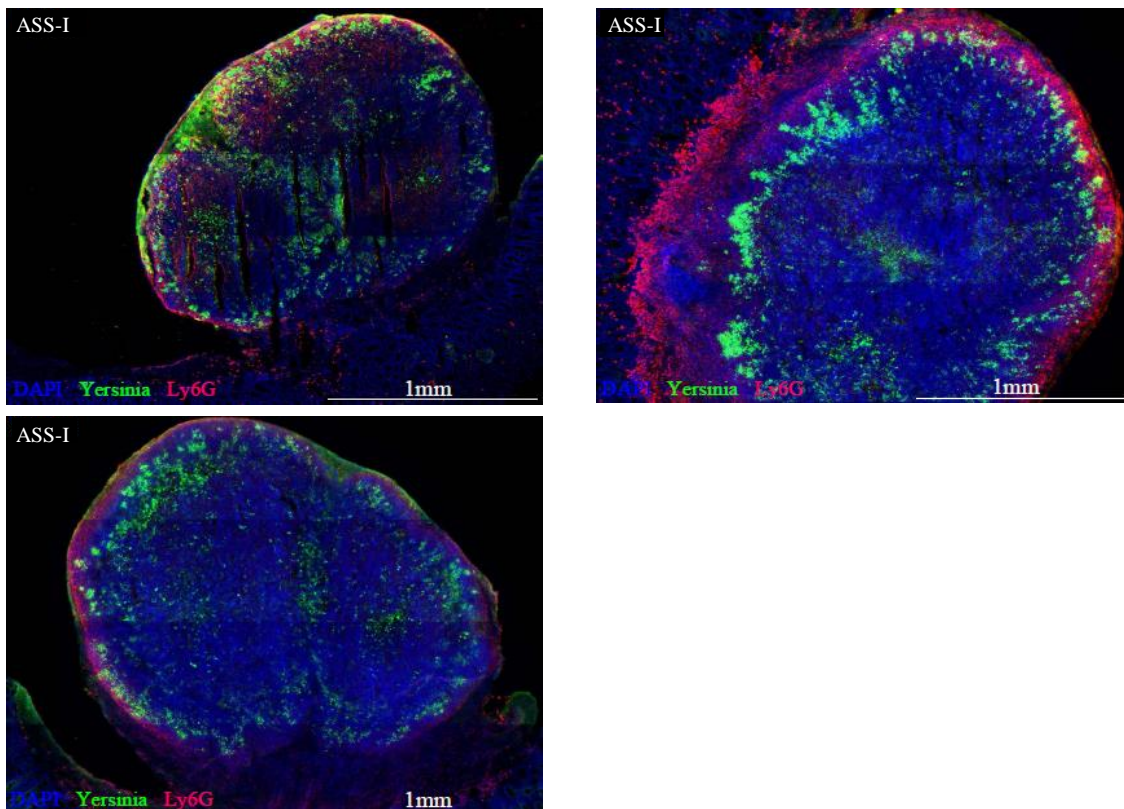


Abb.32: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Peyerschen Plaques infiziert mit WA-C (pYV-ASS-I)

Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-ASS-I). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

ASS-I = pYV-ASS-I in WA-C.

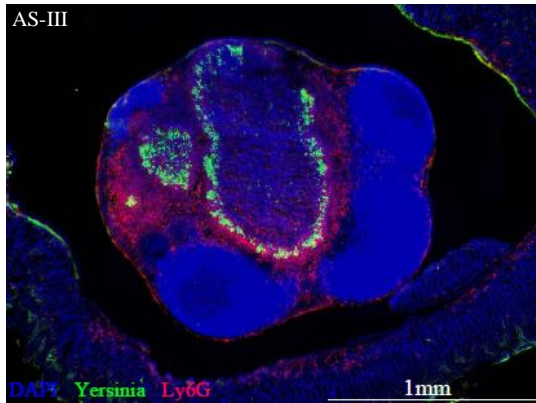
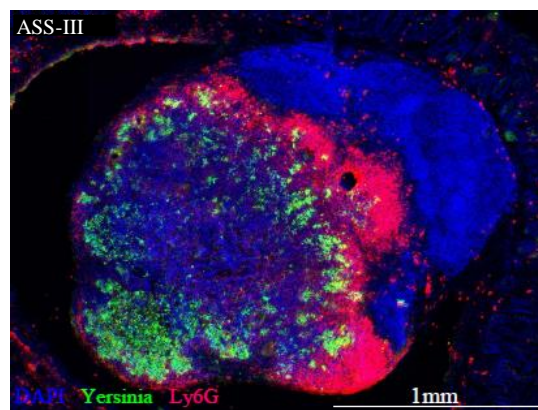
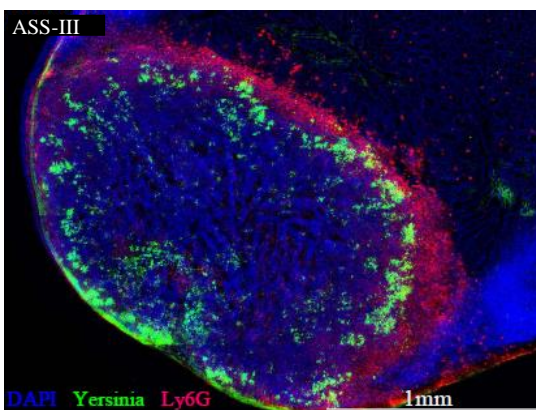
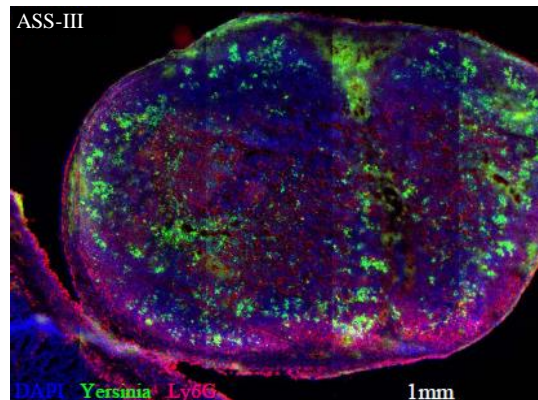
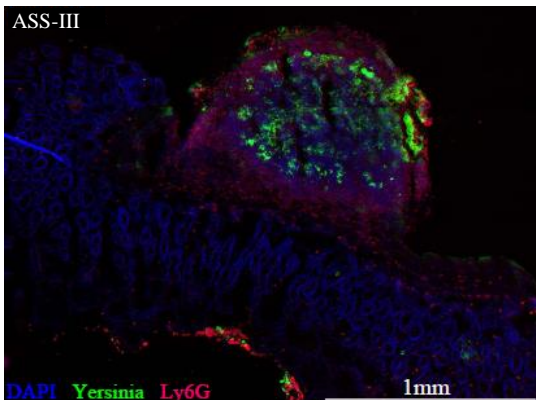


Abb.33: Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-AS-III)

Gewebsschnitt von Peyerschem Plaque aus peroral infizierter BALB/c-Maus (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS-III). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt.

AS-III = pYV-AS-III in WA-C.



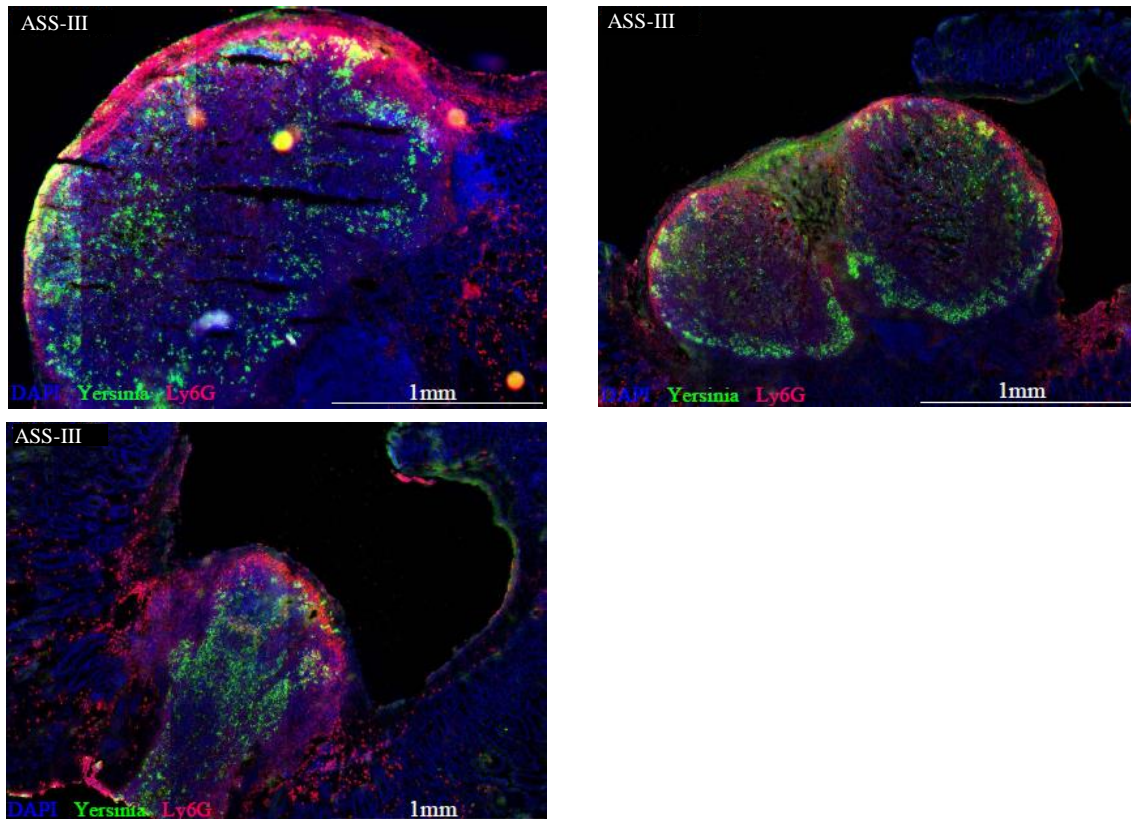
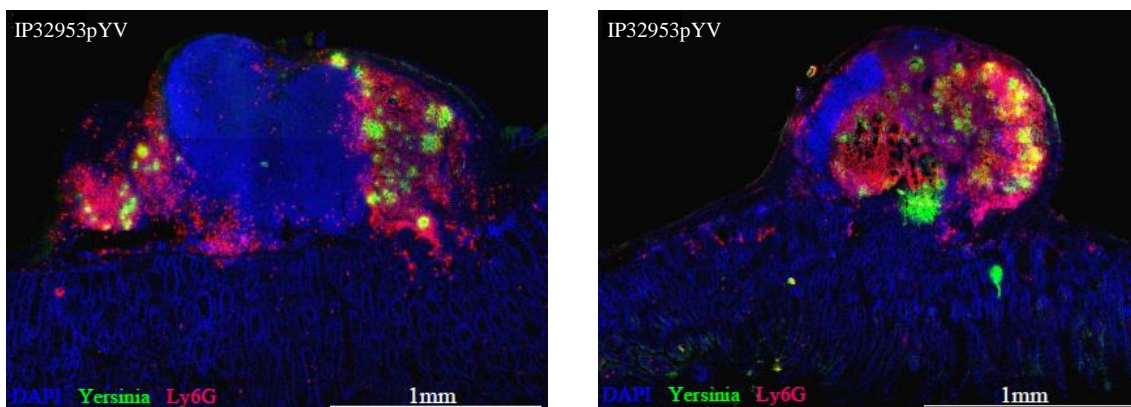


Abb.34: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Peyerschen Plaques infiziert mit WA-C (pYV-ASS-III)

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-ASS-III). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

ASS-III = pYV-ASS-III in WA-C.



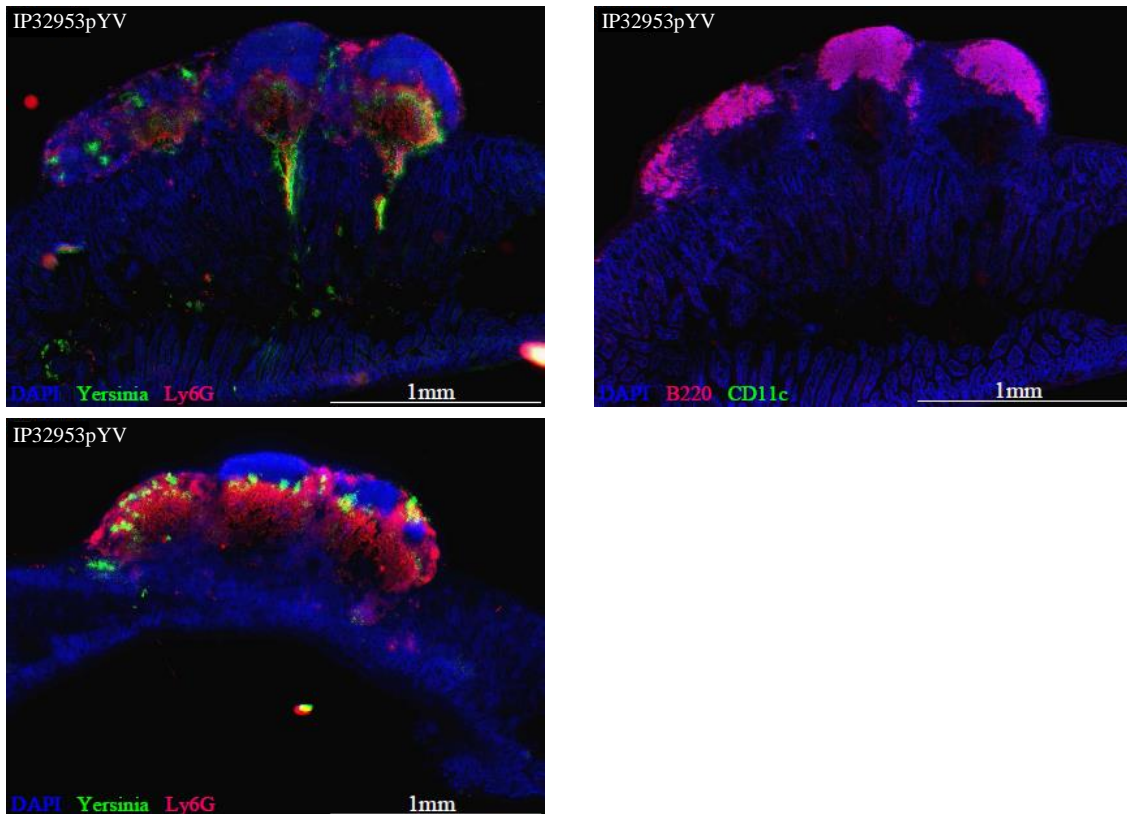


Abb.35: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Peyerschen Plaques infiziert mit IP32953 pYV32953

Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 IP32953 pYV32953. 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) bzw. B220 (Ratte; 1:50) und CD11c (arm. Hamster; 1:50) und den entsprechenden Sekundärantikörpern Cy3-Anti-Ratte (1:2000) und FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) bzw. FITC-Anti. arm. Hamster (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

IP32953pYV = IP32953 mit pYV32953

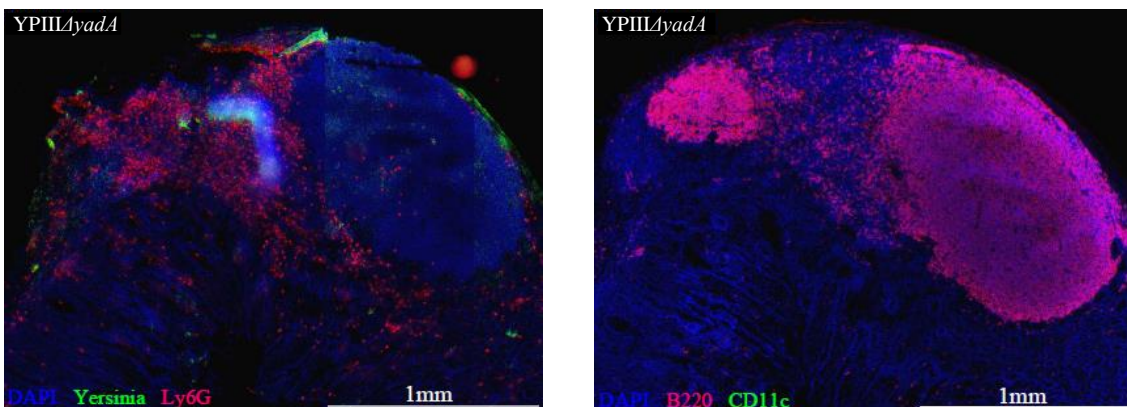


Abb.36: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Peyerschen Plaques infiziert mit YPIII-C pIB1::kanAyadA

Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus peroral infizierter BALB/c-Maus (♀) mit 1×10^9 YPIII-C pIB1::kanAyadA. 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) bzw. B220 (Ratte; 1:50) und CD11c (arm. Hamster; 1:50) und den entsprechenden Sekundärantikörpern Cy3-Anti-Ratte (1:2000) und FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) bzw. FITC-Anti. arm. Hamster (1:2000) gefärbt.

YPIIIAyadA = pIB1::kanAyadA in YPIII-C.

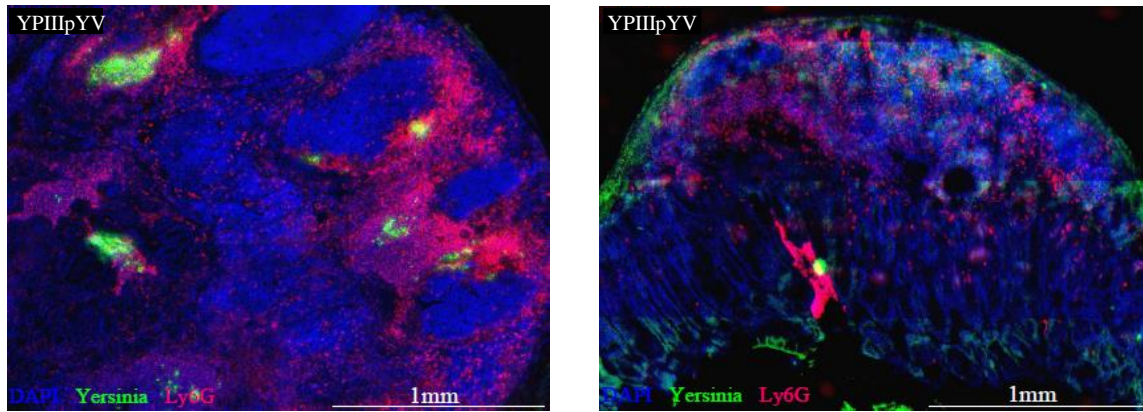


Abb.37: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Peyerschen Plaques infiziert mit YPIII (pIB1)

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte von Peyerschen Plaques aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 YPIII (pIB1). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

YPIIIpYV = YPIII mit pIB1.

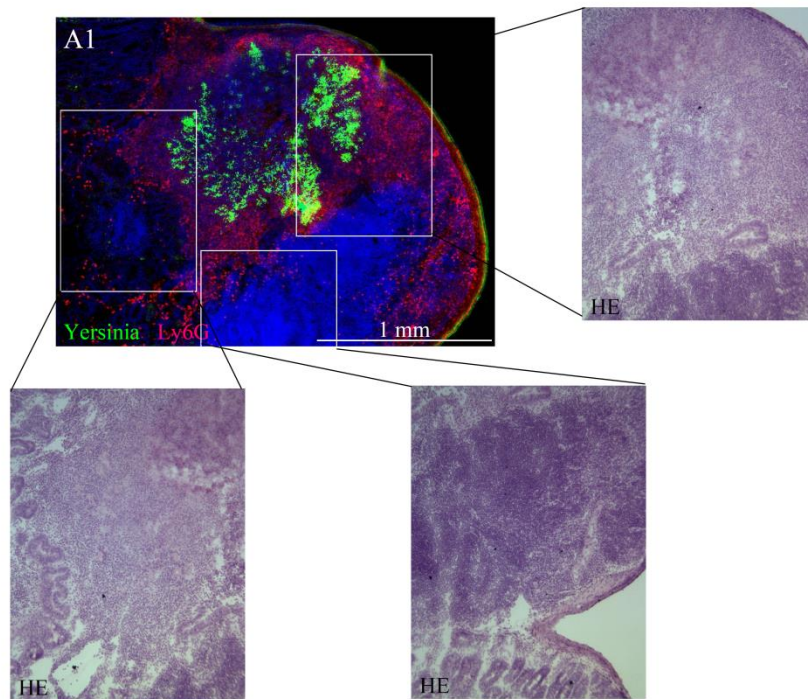


Abb.38: HE-Färbungen im Vergleich mit Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Peyerschem Plaque infiziert mit WA-C (pYV-A1)

Gewebsschnitte eines Peyerschen Plaque aus peroral infizierter BALB/c-Maus (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-A1). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Peyerschen Plaques. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mittels HE-Färbung bzw. mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Hier ist eine Übersichtsaufnahme in Immunfluoreszenz-Färbung mit vergrößerten Ausschnitten in HE-Färbung aus einem Peyerschen Plaque dargestellt.

A1 = pYV-A1

7.3.2 Milzen

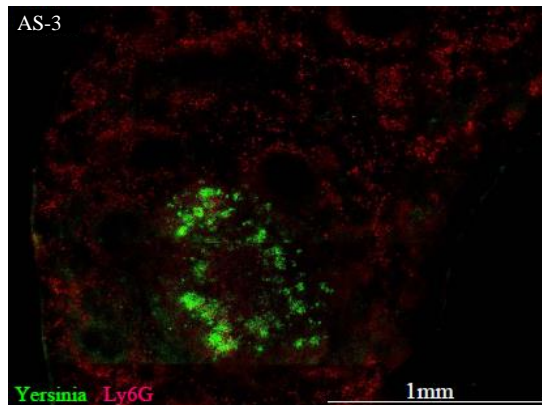


Abb.39: Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, WAVital, Ly6G von Milzgewebe infiziert mit WA-C (pYV-AS-3)

Gewebsschnitt einer Milz aus peroral infizierter BALB/c-Maus (♀) mit 1×10^9 WA-C (pYV-AS-3). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Milzen. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt.

AS-3 = pYV-AS-3 in WA-C.

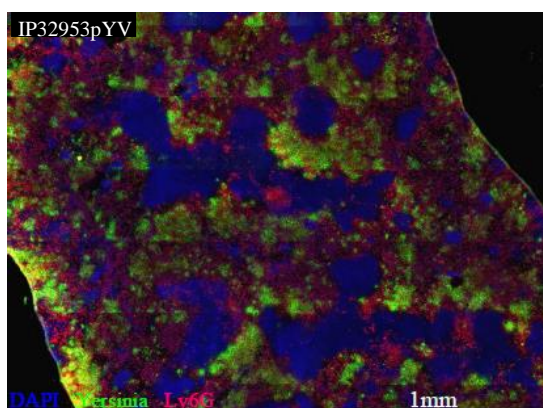
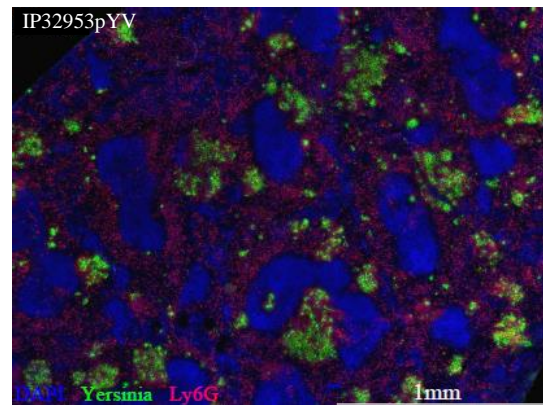
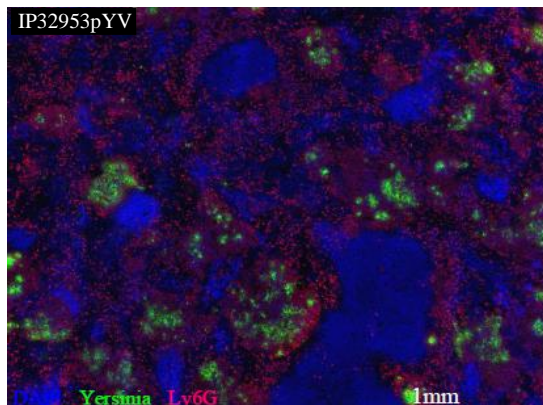


Abb.40: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Milzgewebe infiziert mit IP32953 pYV32953

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte von Milzen aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 IP32953 pYV32953. 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Milzen. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

IP32953pYV = IP32953 mit pYV32953.

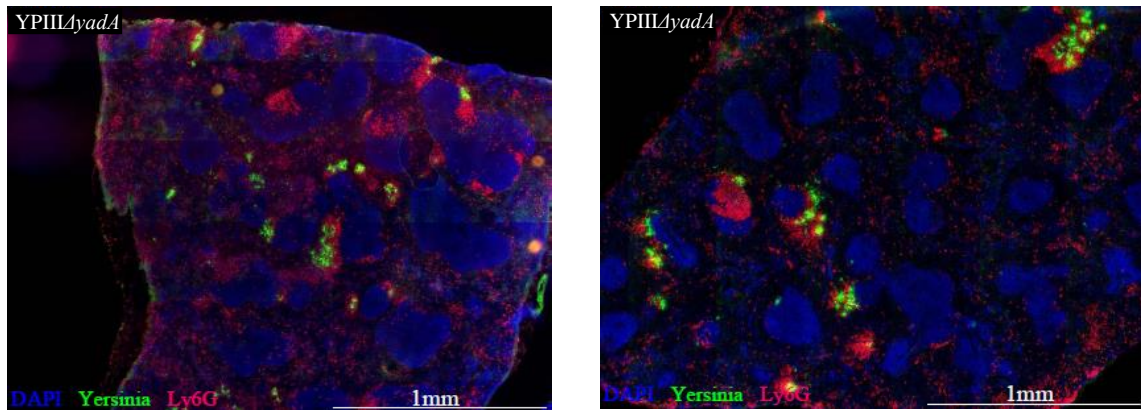


Abb.41: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Milzgewebe infiziert mit YPIII-C (pIB1::kanAyadA)

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte von Milzen aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 YPIII-C (pIB1::kanAyadA). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Milzen. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

YPIIIAyadA = pIB1::kanAyadA in YPIII-C.

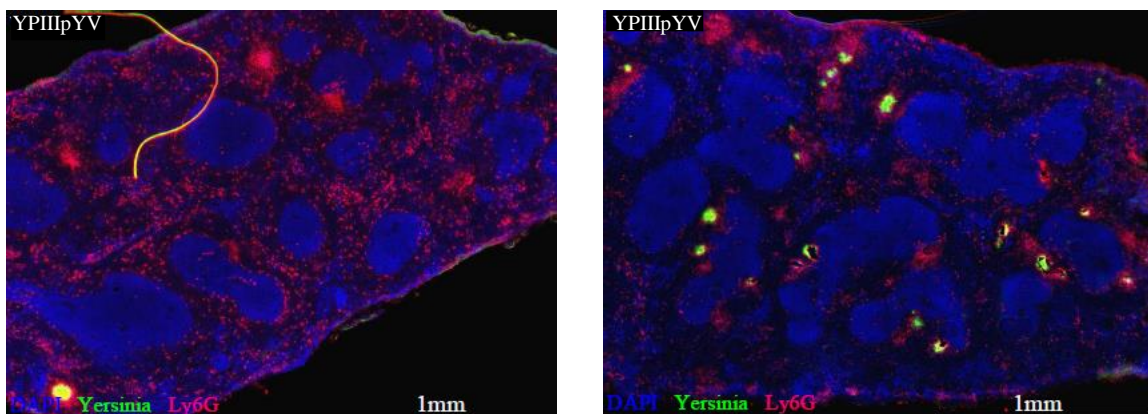


Abb.42: Immunfluoreszenz-Färbungsvergleich von Milzgewebe infiziert mit YPIII (pIB1)

Vergleich repräsentativer Gewebsschnitte von Milzen aus peroral infizierten BALB/c-Mäusen (♀) mit 1×10^9 YPIII (pIB1). 5 Tage nach Infektion erfolgte die Entnahme der Milzen. Hiervon gefertigte Gewebsschnitte wurden mit DAPI und den Primärantikörpern WAVital (Kaninchen; 1:5000) und Ly6G (Ratte; 1:50) und den Sekundärantikörpern FITC-Anti-Kaninchen (1:2000) und Cy3-Anti-Ratte (1:2000) gefärbt. Die hier gezeigten Schnitte stammen von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

YPIIIpYV = YPIII mit pIB1.